

**Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická**

**Stanovení potravinářských aditiv pomocí elektromigračních separačních  
metod**

**Andrea Havlová**

**Bakalářská práce**

**2009**

**University of Pardubice  
Faculty of chemical technology**

**Determination of food additives by electromigration separation methods**

**Andrea Havlová**

**Bachelor work**

**2009**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra analytické chemie  
Akademický rok: 2008/2009

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea HAVLOVÁ**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**

Název tématu: **Stanovení potravinářských aditiv pomocí  
elektromigračních separačních metod**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) V dostupné literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte odkazy týkající se použití přírodních i syntetických aditiv v potravinářství.
- 2) Charakterizujte využití moderních elektromigračních metod pro analýzu potravinářských aditiv.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Václav Staněk, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

**Ing. Petr Česla, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti:

**doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**

Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Souhlasím s veřejným zpřístupněním své práce v univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 9.7.2009

Andrea Havlová

Mou milou povinností je poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Václavu Staňkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petrovi Česlovi, Ph.D. a Ing. Janu Fischerovi, CSc. za informace, které mi poskytli během mého studia.

Děkuji zejména svým rodičům za umožnění studia na Univerzitě Pardubice a za jejich podporu v jeho průběhu. Nemalý dík patří i mé sestře Daniele Havlové za poskytnutí užitečných technických rad.

## **Souhrn**

Tato bakalářská práce je zaměřena na v praxi používaná potravinářská aditiva, mezi něž patří především syntetická barviva, přírodní a syntetické antioxidanty, sladidla a konzervační látky. V práci byly dále sledovány možnosti stanovení těchto látek v potravinách pomocí elektromigračních separačních metod, kdy byly nejčastěji využívány techniky kapilární elektroforézy.

**Klíčová slova:** Potravinářská aditiva  
Analýza potravin  
Elektromigrační separační metody  
Kapilární elektroforéza

## **Summary**

This bachelor work describes various synthetic dyes, natural and synthetic antioxidants, sweeteners and preservatives, used as food additives and their determination in food-stuff by modern electromigration separation methods, mostly by capillary electrophoresis techniques.

**Keywords:** Food additives  
Food analysis  
Electromigration separation methods  
Capillary electrophoresis



## Obsah:

1. Úvod .....	11
2. Kapilární elektroforéza (CE) .....	12
2.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) .....	13
2.1.1. Princip CZE .....	13
2.1.2. Transportní jevy v CZE .....	14
2.1.2.1. Elektroforetická migrace .....	14
2.1.2.2. Elektroosmotický tok.....	16
2.1.3. Způsoby dávkování vzorku .....	18
2.1.4. Způsoby detekce .....	18
2.2. Kapilární izotachoforéza (CITP) .....	20
2.3. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) .....	21
2.4. Kapilární elektrochromatografie (CEC) .....	21
2.5. Kapilární gelová elektroforéza (CGE).....	22
2.6. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF).....	23
3. Potravinářská aditiva .....	24
3.1. Potravinářská barviva .....	24
3.1.1. Stanovení potravinářských aditiv .....	25
3.1.1.1. Stanovení potravinářských barviv pomocí CZE.....	25
3.1.1.2. Stanovení potravinářských barviv pomocí MEKC a CEC .....	27
3.2. Antioxidanty .....	27
3.2.1. Stanovení antioxidantů .....	28
3.2.1.1. Stanovení antioxidantů pomocí CZE a CITP .....	28
3.2.1.2. Stanovení antioxidantů pomocí MEKC a CEC .....	29
3.3. Sladidla .....	30
3.3.1. Stanovení sladidel.....	30
3.4. Konzervační látky .....	31
3.4.1. Stanovení konzervačních látek .....	31
4. Závěr.....	33
5. Seznam použité literatury .....	34

## Použité zkratky:

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>AOT</b>	Bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát sodný
<b>BHA</b>	Butylhydroxyanizol
<b>BHQ</b>	<i>Terc</i> -butylhydrochinon
<b>BHT</b>	Butylhydroxytoluen
<b>CE</b>	Kapilární elektroforéza
<b>CEC</b>	Kapilární elektrochromatografie
<b>CGE</b>	Kapilární gelová elektroforéza
<b>CIEF</b>	Kapilární izoelektrická fokusace
<b>CITP</b>	Kapilární izotachoforéza
<b>CZE</b>	Kapilární zónová elektroforéza
<b>DAD</b>	Diode-array detektor
<b>DG</b>	Dodecyl gallát
<b>ED</b>	Elektrochemický detektor
<b>EOF</b>	Elektroosmotický tok
<b>GC</b>	Plynová chromatografie
<b>HPLC</b>	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
<b>LIF</b>	Laserem indukovaná fluorescence
<b>MEKC</b>	Micelární elektrokinetická chromatografie
<b>MS</b>	Hmotnostní spektrometrie
<b>OG</b>	Octyl gallát
<b>PAGE</b>	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
<b>PG</b>	Propyl gallát
<b>PTFE</b>	Polytetrafluorethylen, teflon
<b>SDS</b>	Dodecylsulfát sodný
<b>SPE</b>	Extrakce tuhou fází
<b>TLC</b>	Chromatografie na tenké vrstvě
<b>UV</b>	Ultrafialový
<b>VIS</b>	Viditelný

# 1. Úvod

Potravinářská aditiva jsou účelově přidávána do různých druhů potravin a tudíž plní nepostradatelnou funkci. Rozlišují se dvě skupiny těchto látek, přírodní a syntetické. Přídavnými látkami v potravinách se rozumí např. konzervační látky, antioxidanty, sladidla, barviva, dusičnany a dusitany. Jsou to látky, které mají určitým způsobem prodlužovat trvanlivost potravin, zvýrazňovat vůni či chuť. Některé pro nás mohou být škodlivé, jiné nám naopak dodávají potřebné živiny a tím jsou našemu tělu prospěšné. Může se však stát, že se v potravinách vyskytnou i látky, které nijak přidány nebyly, např. antibiotika, která mohou vznikat produkcí některých mikroorganismů. V potravinách jsou dále sledovány biologicky aktivní složky [1], mezi které patří anorganické a organické kyseliny, aminokyseliny, vitamíny, fenolické sloučeniny, biogenní aminy, toxiny a spousta dalších. Obsah všech těchto látek v potravinách lze stanovit pomocí analytických separačních metod, např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), plynovou chromatografií (GC) a v poslední době i pomocí technik kapilární elektroforézy (CE).

Postupný vývoj elektromigračních separačních metod započal již v 19. století. V roce 1897 popsal německý chemik F. Kohlrausch princip elektromigrace iontů [2]. V roce 1948 obdržel švédský chemik A. Tiselius Nobelovu cenu za výzkum v oblasti separací proteinů krevního séra v křemenných U-trubicích [3], čímž vlastně položil základy pro využití elektroforézy v analytické chemii. Vůbec první laboratorní zařízení pro CE bylo sestrojeno v roce 1967 Hjerténem [4], kdy v podélně rotujících skleněných trubicích o vnitřním průměru 3 mm byly provedeny elektroforetické separace anorganických iontů, proteinů a nukleových kyselin. Moderní éra kapilární elektroforézy (CE) pak nastává od roku 1981, kdy Jorgenson a Lukacs poprvé využili pro elektroforetické separace aminokyselin křemenné kapiláry [5]. Jejich tehdejší zařízení je dodnes základem většiny komerčních přístrojů pro CE.

V současné době pak představuje CE významnou moderní analytickou metodu, která se postupně zařadila mezi ostatní rutinně používané metody pro separace v kapalné fázi [6].

## 2. Kapilární elektroforéza (CE)

V současné době se používá celkem šest základních experimentálních technik kapilární elektroforézy (viz. tabulka 1):

- 1) Kapilární zónová elektroforéza (CZE);
- 2) Kapilární izotachoforéza (CITP);
- 3) Micelární elektrokinetická kapilární elektrochromatografie (MEKC);
- 4) Kapilární elektrochromatografie (CEC);
- 5) Kapilární gelová elektroforéza (CGE);
- 6) Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF).

Všechny tyto techniky mají společný základ v separaci látek účinkem elektrického pole během migrace v roztoku a kapilární formát instrumentace elektroforézy, liší se však vlastním mechanismem separace.

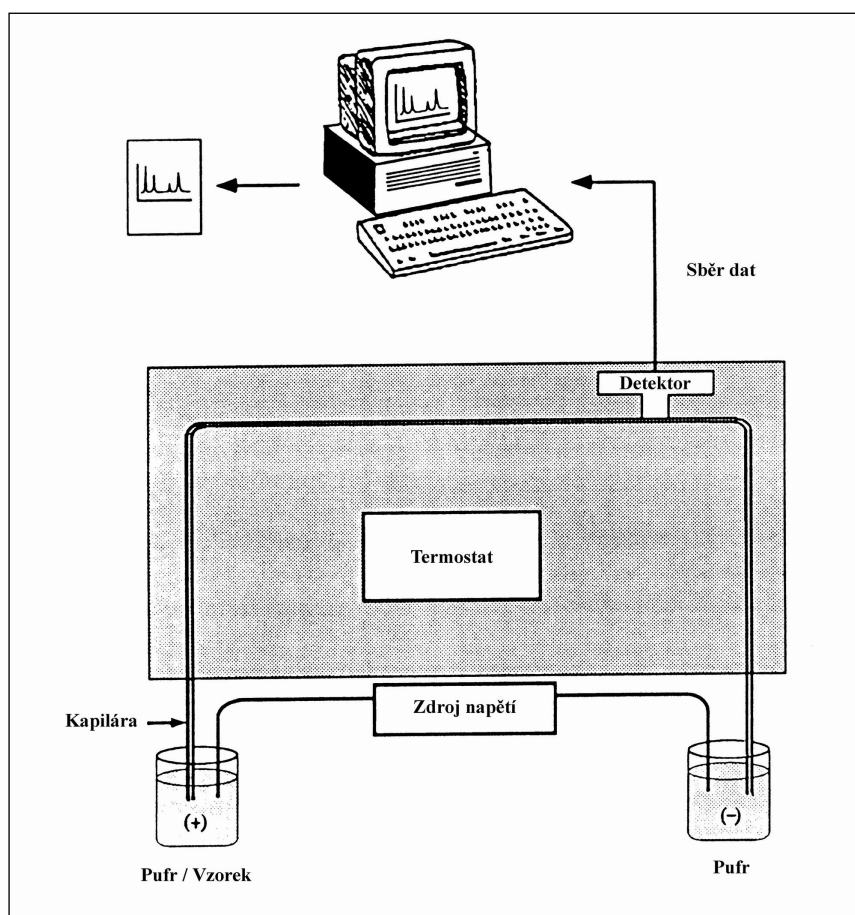
**Tabulka 1:** Rozdělení CE technik [6].

<b>Technika</b>	<b>Mechanismus separace</b>
kapilární zónová elektroforéza CZE	elektroforetická mobilita
kapilární izotachoforéza CITP	elektroforetická mobilita (diskontinuální)
micelární elektrokinetická chromatografie MEKC	hydrofilní a iontové interakce s micelami
kapilární elektrochromatografie CEC	rozdělování mezi stacionární fází v kapiláře a tok mobilní fáze způsobený elektrickým polem
kapilární gelová elektroforéza CGE	síťový efekt (dělení podle molekulové hmotnosti, párů bází, ...)
kapilární izoelektrická fokusace CIEF	izoelektrický bod (pI)

## 2. 1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

### 2. 1. 1. Princip CZE

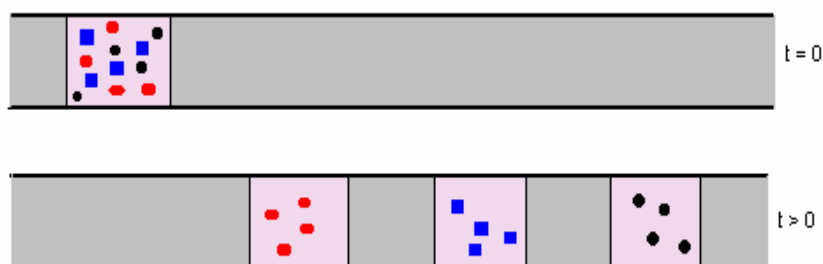
Principem této metody je rozdílná migrace elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektrické pole se vytváří vložením konstantního napětí na elektrody, které jsou ponořeny do pracovního elektrolytu. Elektrolyt se volí podle charakteru látek, které chceme separovat. Pomocí CZE lze separovat anorganické i organické částice iontové povahy.



**Obr. 1:** Schéma přístroje pro kapilární zónovou elektroforézu (CZE) [7].

Schéma přístroje pro CZE je znázorněno na obr.1. Pro separaci se používají křemenné kapiláry, na povrchu pokryté polyimidovou vrstvou, která zajišťuje pružnost a odolnost jinak křehkého křemene. Většinou bývají o vnitřním průměru 25 – 100  $\mu\text{m}$  a

celkové délce 15 – 80 cm, která závisí na uspořádání konkrétního přístroje. Pracovní elektrolyt, kterým je separační kapilára naplněna (např. roztok tetraboritanu sodného), funguje jako pufr, který udržuje optimální pH celého systému. Na začátek separační kapiláry se dávkuje analyzovaný vzorek, jehož jednotlivé složky se mají rozdělit. Po vložení vysokého napětí (desítky kV) na dvojici platinových elektrod začne pracovním elektrolytem procházet elektrický proud, jehož hodnota by měla být maximálně do 100  $\mu\text{A}$ . Průběh separace pomocí kapilární zónové elektroforézy je znázorněn na obr. 2.



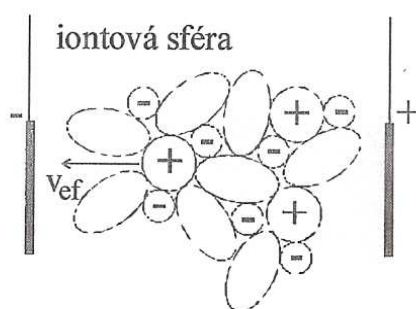
**Obr. 2:** Schéma separace vzorku pomocí CZE. Stav před průchodem proudem (nahore) a po dosažení úplné separace (dole) [8].

## 2. 1. 2. Transportní jevy v CZE

Kapilární zónová elektroforéza využívá dvou elektrokinetických jevů, a to elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli (vlastní elektroforéza) a elektroosmotického toku kapaliny křemennou kapilárou (elektroosmóza).

### 2. 1. 2. 1. Elektroforetická migrace

Každá částice nesoucí kladný nebo záporný náboj putuje vlivem elektrického pole k opačně nabitě elektrodě, a to konstantní elektroforetickou rychlostí,  $v_{ef}$ . Tento jev je označován též jako elektrostatické přitahování a jeho průběh je zobrazen na obr. 3.



**Obr. 3:** Elektrostatické přitahování a elektroforetická migrace kationtu ke katodě [9].

Pro tento děj platí následující vztahy:

$$F_1 = z_i \cdot E \quad (1)$$

Ze vztahu (1) vyplývá, že síla, působící na částici ve vodivém prostředí,  $F_1$ , je přímo úměrná intenzitě elektrického pole  $E$  [ $\text{V m}^{-1}$ ]. Symbol  $z_i$  značí náboj částice. Částice je ovlivňována nejenom elektrostatickým přitahováním, ale i viskozitou prostředí  $\eta$ , svou velikostí (poloměrem)  $r$  a tvarem, tak jak je to vyjádřeno ve vztahu (2), popisujícím odpor prostředí pomocí brzdné síly  $F_2$ . Posléze se obě síly vyrovnají.

$$F_2 = -k \cdot v = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v \quad (2)$$

Podílem napětí  $U$  [V], které je vloženo na pracovní elektrody, a délky kapiláry  $l_c$  [m] získáme velikost intenzity elektrického pole  $E$ , jak je uvedeno ve vztahu (3).

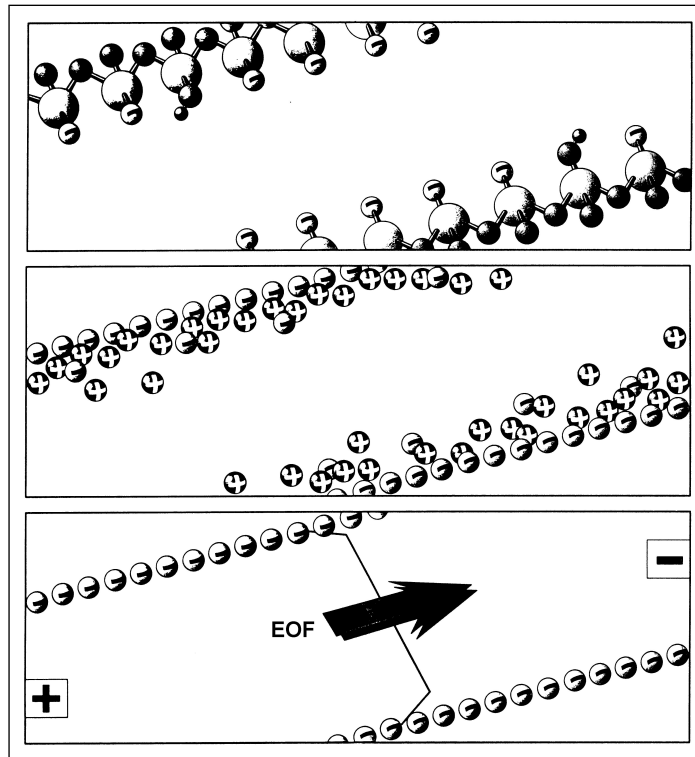
$$E = \frac{U}{l_c} \quad (3)$$

Elektroforetická rychlost částice  $v_{ef,i}$  [ $\text{m s}^{-1}$ ] v elektrickém poli úzce souvisí s elektroforetickou mobilitou (pohyblivostí) částice  $\mu_{ef,i}$  [ $\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ]. Ta závisí na charakteru migrujícího iontu, což se projeví na jeho rychlosti pohybu. Čím menší je jeho náboj a větší celková velikost, tím se iont pohybuje pomaleji, jak vyplývá ze vztahu (4). Elektroforetická mobilita je rovněž významně ovlivnitelná změnami pH pracovního elektrolytu.

$$v_{ef,i} = \mu_{ef,i} \cdot E = \frac{Q_i}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot E} \quad (4)$$

### 2. 1. 2. 2. Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) neboli elektroosmóza je velice důležitý jev uplatňující se u elektroforetické migrace iontů. EOF je způsobený disociací volných silanolových skupin na vnitřních stěnách křemenné kapiláry, vyplněné pracovním elektrolytem, takže se zde vytvoří záporný náboj. Ke stěně je pak poutána vrstva kationů pocházejících z pracovního elektrolytu a vznikne tak stabilní elektrická dvojvrstva, která je zdrojem  $\zeta$ -potenciálu (obr. 4). Navenek se elektroosmotický tok projeví pohybem kapaliny uvnitř kapiláry po připojení elektrického napětí na kapiláru [10].



**Obr. 4:** Princip elektroosmózy. Disociace povrchových silanolových skupin křemenné kapiláry (nahore), vytváření dvojvrstvy u stěny kapiláry (uprostřed), vznik elektroosmotického toku po připojení napětí (dole) [10].

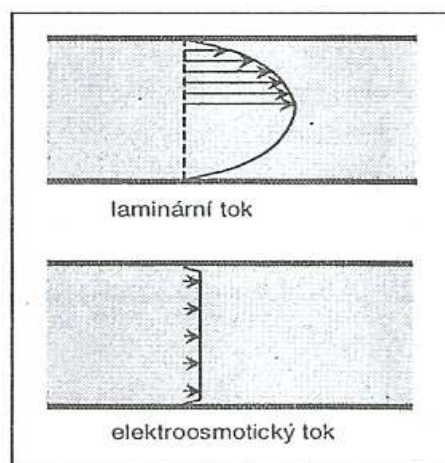


Rychlost elektroosmotického toku,  $v_{eof}$ , závisí na již zmiňovaném  $\zeta$ -potenciálu, vnitřním průměru kapiláry a viskozitě roztoku, což popisuje vztah (5), ale i na intenzitě elektrického náboje  $E$  a elektroosmotické mobilitě  $\mu_{eof}$ , jak je uvedeno ve vztahu (6).

$$\zeta = \frac{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot v_{eof}}{\varepsilon \cdot E} \quad (5)$$

$$v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E \quad (6)$$

Míra disociace silanolových skupin na vnitřní stěně křemenné kapiláry závisí na pH pracovního elektrolytu, tudíž je na hodnotě pH závislý i elektroosmotický tok, kdy s rostoucím pH výrazně roste jeho velikost a elektroosmotická mobilita pak může převyšovat elektroforetickou mobilitu většiny separovaných iontů. Protože je elektroosmotický tok vyvolán nábojem na vnitřním povrchu kapiláry, je profil tohoto toku plochý (pístový), na rozdíl od parabolického profilu laminárního proudění (obr. 5), které se uplatňuje u chromatografických separací v kapalně fázi.



**Obr. 5:** Rychlostní profily laminárního toku a elektroosmotického toku [11].

Velikost EOF má vliv na elektroforetickou mobilitu jednotlivých částic, kdy hovoříme o tzv. zdánlivé mobilitě, která je dána součtem elektroforetické mobility elektroosmotického toku a elektroforetické mobility dané částice. Musíme ovšem brát do úvahy i směr pohybu obou mobilit, tudíž se jedná o vektorový součet, vyjádřený vztahem (7) [12].

$$\bar{\mu}_{app} = \bar{\mu}_{eo} + \bar{\mu}_{eff} \quad (7)$$

kde  $\mu_{app}$  je zdánlivá pohyblivost dané látky.

### 2. 1. 3. Způsoby dávkování vzorku

U CZE se do separační kapiláry dávkuje vzorek o objemu v jednotkách až desítkách nanolitřů. Rozlišuje se dvojí způsob dávkování. Prvním je elektrokinetické dávkování, kdy se konec kapiláry vloží pod hladinu vzorku v nádobce, po kratší dobu se vloží nízké napětí na elektrody a tím je zajištěno nadávkování vzorku do kapiláry. Druhým způsobem je dávkování hydrodynamické, kdy se využívá natlakování nádoby se vzorkem, do které je ponořena separační kapilára, vzduchem a vzniklým přetlakem dojde k nadávkování vzorku, případně lze využít i nadávkování vzorku pomocí sifonového efektu. Hydrodynamické dávkování je v porovnání s elektrokinetickým způsobem více reprodukovatelné [9], proto se s ním v praxi setkáváme ve většině případů.

### 2. 1. 4. Způsoby detekce

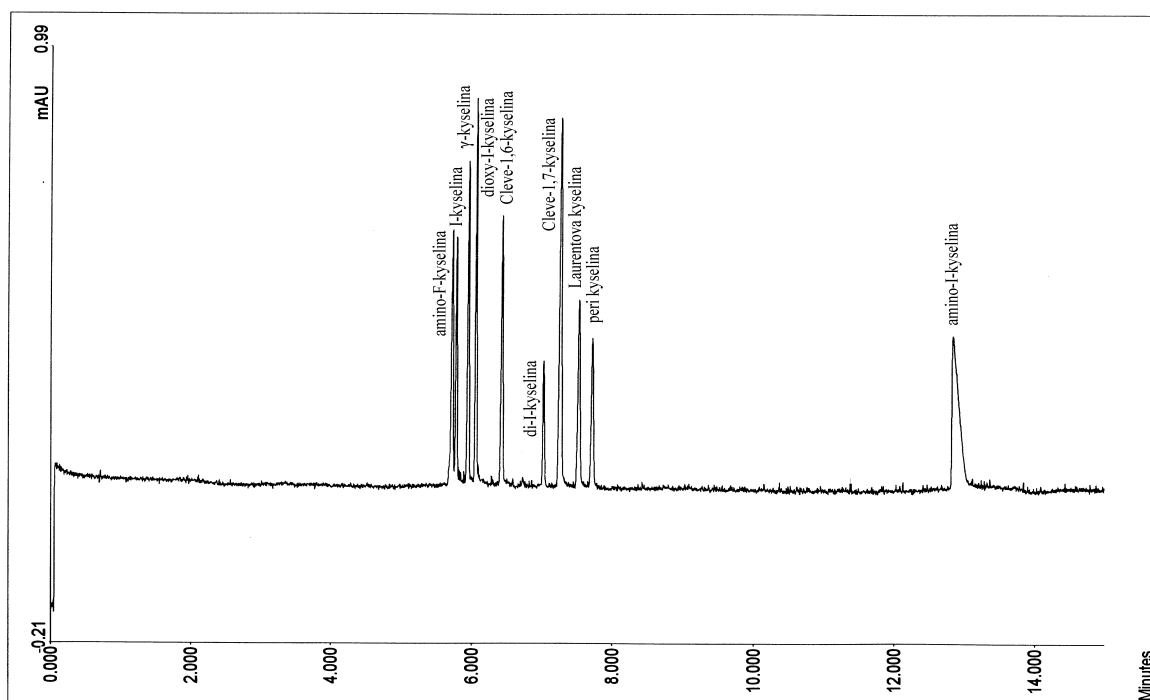
Detektory používané pro CZE musí být vzhledem k malým rozměrům separační kapiláry velmi citlivé. Nejčastěji se setkáváme s UV/VIS detekcí, která se provádí v tzv. “on-column” uspořádání, kdy paprsek UV nebo VIS světla prochází přímo separační kapilárou s odstraněným polyimidovým ochranným povlakem. Protože je zde velmi krátká optická dráha, je v tomto případě lineární detekční rozsah podstatně menší než u HPLC. Optickou dráhu lze ale prodloužit např. vytvořením bublinky na kapiláře v místě detekce, tzv. “bubble cell” [10]. Mezi UV detektory patří rovněž DAD detektory, které umožňují současně změřit absorpční spektra analyzovaných látek. Pro detekci látek, které neabsorbují v UV/VIS oblasti, můžeme použít nepřímou UV detekci, kdy pracovní elektrolyt obsahuje ion absorbující v UV oblasti, např. chroman pro stanovení anorganických iontů [13].

Výrazně vyšší citlivost detekce u CZE analýz lze získat pomocí měření fluorescence nebo laserem indukované fluorescence (LIF). Nevýhodou je, že většina analyzovaných látek sama nefluoreskuje, a proto je třeba vzorky před analýzou

derivatizovat. Vhodným výběrem fluoroforu s excitačním maximem v oblasti vlnové délky použitého laseru lze významně snížit detekční limit až na řádově stovky detekovaných molekul.

Hodně používaným způsobem detekce u CZE je vodivostní detekce, která je však velmi náročná na instrumentaci. Běžně komerčně dostupná je “end-column” konstrukce s detekční celou na konci kapiláry [14], poskytující vysokou citlivost detekce. Ze skupiny elektrochemických detektorů bylo rovněž popsáno použití amperometrického způsobu detekce signálu. V neposlední řadě lze pro CZE detekci použít spojení s hmotnostním detektorem (MS), který je vysoce univerzální, avšak za cenu komplikací spojených s úzkým výběrem vhodného pracovního elektrolytu [15].

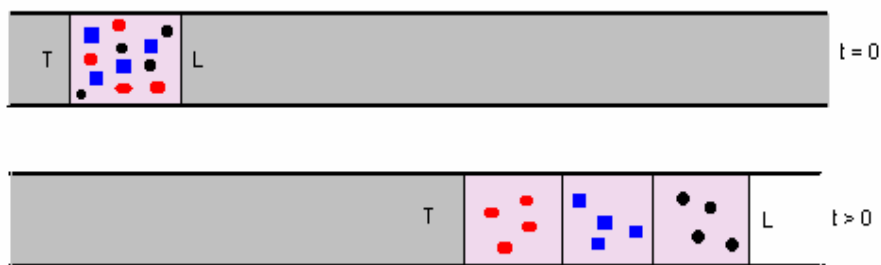
Vyhodnocení signálu vycházejícího z detektoru se provádí pomocí osobního počítače za využití různých komerčně dodávaných vyhodnocovacích programů. Vzniklé záznamy se nazývají elektroforegramy a jedná se o závislost intenzity signálu detektoru na čase. Analyzovaná látka se pak na elektroforegramu projeví jako tzv. pík, kdy jeho poloha odpovídá migračnímu času dané látky (kvalita) a jeho výška, resp. jeho plocha je pak přímo úměrná množství této látky v separovaném vzorku (kvantita). Typický elektroforegram je znázorněn na obr. 6.



**Obr. 6:** Ukázka elektroforegramu zaznamenaného pro CZE separaci směsi substituovaných naftalensulfonových kyselin, používaných pro výrobu syntetických barviv [16].

## 2. 2. Kapilární izotachoforéza (CITP)

Kapilární izotachoforéza (CITP) patří mezi nejstarší CE techniky a slouží k separaci buď aniontů a nebo kationtů [17]. Princip kapilární izotachoforézy je velmi podobný principu kapilární zónové elektroforézy, kdy se separace analyzovaných iontů provádí na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit ve stejnosměrném elektrickém poli, avšak v případě izotachoforézy se používají dva charakteristické elektrolyty. Ten první je tzv. elektrolyt vedoucí neboli “leading” (L), který obsahuje ion s větší migrační rychlostí než je rychlost analyzovaných iontů. Druhý je tzv. elektrolyt koncový neboli “terminaiting” (T), který naopak obsahuje ion s nižší migrační rychlostí než je rychlost analyzovaných iontů. Před vlastní separací se vzorek nadávkuje na začátek kapiláry právě mezi vedoucí a koncový elektrolyt a vlivem stejnosměrného elektrického pole se pak složky vzorku rozdělí na základě rozdílných mobilit, kdy rychlejší ionty se dostávají blíže k vedoucímu elektrolytu a pomalejší ionty ke koncovému elektrolytu. Po čase, až dojde k ustálenému stavu, vytvoří separované ionty zóny, které se pohybují konstantní rychlostí, jak je znázorněno na obr. 7.



**Obr. 7:** Princip CITP separace analyzovaného vzorku. Stav před průchodem proudem (nahore) a stav po dosažení ustáleného stavu (dole) [8].

Separční kapiláry pro CITP jsou zhotoveny buď z teflonu (PTFE) nebo z křemenného skla s vnitřním povrchem pokrytým vrstvičkou hydroxyethylcelulosity [18]. Pro detekci signálu se používají zejména vodivostní a spektrofotometrické detektory. V současné době se kapilární izotachoforéza používá zejména ve spojení s kapilární zónovou elektroforézou (CITP-CZE). Toto spojení využívá předností obou technik a je

cíleně určeno pro stopovou analýzu vzorků se složitou a proměnlivou maticí. Zatímco v izotachforetickém kroku lze stanovit a odstranit makrosložky vzorku, v následném CZE kroku lze stanovit předchozím krokem zakoncentrované mikrosložky vzorku. V praxi se spojení CIP-CZE používá zejména pro analýzy stopových látek v biologických maticích, lze je však použít i pro stanovení potravinářských aditiv [19].

### **2. 3. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)**

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) byla poprvé popsána v roce 1984, jedná se tedy o poměrně mladou moderní elektromigrační separační techniku, která kombinuje principy micelární chromatografie a kapilární zónové elektroforézy [20] a slouží k elektroforetické separaci neutrálních částic. Při MEKC dochází k dělení látek mezi pseudostacionární fází (micelární) a vodnou mobilní fází (pracovní elektrolyt). Do pracovního elektrolytu se přidává povrchově aktivní látka, např. SDS, a z ní vznikají tzv. micely, které mají kulovitý tvar a jsou záporně nabitě. I když se micely pohybují proti směru EOF, jejich rychlost pohybu je menší a tudíž jsou unášeny v roztoku pracovního elektrolytu směrem k detektoru. Analyzované neutrální látky, které sice samy o sobě nemají žádný náboj, ale mohou interagovat s micelami, jsou pak separovány právě na základě rozdělení složek vzorku mezi micelární a vodnou fází. Pseudostacionární fáze nemusí být tvořena výhradně micelami, lze použít i cyklodextriny nebo jiné polymery [12].

### **2. 4. Kapilární elektrochromatografie (CEC)**

Kapilární elektrochromatografie (CEC) je elektromigrační separační technika založená na kombinaci principů CZE a HPLC a lze říci, že se v současnosti jedná o nejrychleji se rozvíjející CE techniku [21]. Instrumentální uspořádání je velmi podobné jako v případě samotné CZE, avšak separační kapilára je stejně jako u HPLC naplněna

stacionární fázi a hnací silou je tak jako u CZE elektroosmotický tok. Pracovní elektrolyt je pak v kontaktu nejen s vnitřní stěnou křemenné kapiláry, ale i s povrchem náplně kapiláry a neutrální částice i ionty jsou v něm separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází, ionty se navíc pohybují v elektrickém poli rozdílnými rychlostmi podle jejich efektivních mobilit. Plochý rychlostní profil elektroosmotického toku v porovnání s parabolickým profilem u HPLC (obr. 5), jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.2.2., má pak za následek mnohem vyšší separační účinnost CEC. Jako separační kapilární kolony se nejčastěji používají buď kapiláry naplněné různými stacionárními fázemi, umístěnými mezi miniaturními fritami, a nebo se používají kolony s polymerními náplněmi, tzv. monolitické kolony.

## 2. 5. Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

Gelová elektroforéza je metoda, při které jsou od sebe látky rozdělovány na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti), což se projeví rozdílnou elektroforetickou rychlostí pohybu v gelu. Pohyblivost v gelu není jen závislá na molekulové hmotnosti látky, ale také na náboji této látky, na intenzitě elektrického pole a samotné porozitě gelu.

V kapilární gelové elektroforéze (CGE) se využívají křemenné kapiláry naplněné různými gely, např. agarosovým nebo polyakrylamidovým gelem (PAGE), který je kovalentně navázán na vnitřní stěnu kapiláry. Z důvodů obtížné plnitelnosti kapilár těmito gely a také díky jejich nízké životnosti se ale postupně začaly používat roztoky lineárních polymerů vytvářejících tzv. molekulová síta, kdy opět dochází k separaci analyzovaných látek podle míry zpomalení jejich pohybu při průchodu sítem, tzn. že jejich pohyblivost klesá s rostoucí molekulovou hmotností dotyčné látky. Pomocí CGE lze separovat nejrozumnější biologicky významné vysokomolekulární látky, např. sacharidy, peptidy, bílkoviny a nukleotidy, a rovněž lze pomocí CGE určovat molekulové hmotnosti látek (např. DNA a RNA) [9].

## 2. 6. Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)

Při kapilární izoelektrické fokusaci (CIEF) je umožněno dělení amfoterních látek, tj. látek současně vykazujících vlastnosti kyselin i zásad, např. bílkovin, aminokyselin, peptidů nebo proteinů, a to na základě jejich izoelektrických bodů (pI), tzn. podle rozložení kladného a záporného náboje v jejich molekulách [22]. Pro CIEF je nutné používat kapiláry s modifikovaným vnitřním povrchem kvůli minimalizaci EOF, aby separace probíhala jen na základě elektroforetické migrace analyzovaných molekul. Separace probíhá v prostředí gradientu pH, kdy na anodickém konci kapiláry je umístěna nádobka s kyselým elektrolytem a na katodickém konci nádobka s bazickým elektrolytem. Vlivem vloženého napětí pak migrují nabitě částice až do místa, jehož hodnota pH je rovna izoelektrickému bodu dané částice, čímž dojde k rozdělení vzorku na jednotlivé zóny se stejnou hodnotou pI. Pro detekci fokusovaných zón, např. UV detektorem, musí být po dosažení ustáleného stavu provedena následná mobilizace, nejčastěji hydrodynamickým tokem vyvolaným přetlakem nebo podtlakem na koncích separační kapiláry [12].

### 3. Potravinářská aditiva

Přídavné látky jsou takové látky, které se přidávají do potravin za účelem prodloužení trvanlivosti produktu, ale také kvůli zlepšení jejich organoleptických vlastností, zejména vůně, chuti a často také barvy potraviny.

Tato práce je zaměřena na stanovení přídavných látek v potravinách pomocí kapilární zónové elektroforézy a ostatních CE technik. Mezi tyto látky jsou řazeny například konzervanty, antioxidanty, sladidla a barviva, která mohou být přidávány rovněž i do nápojů. Mezi takovéto látky dále patří niacin [23], cholin a rovněž kofein, který je takto označován ale pouze v případě, že se nevyskytuje v potravine přirozeně. Každá země má předepsaný seznam možných aditiv, které se do potravin mohou přidat. Přídavné látky se rozdělují na dva základní typy, a to přírodní a syntetické [24]. Dle legislativních předpisů je nutné uvádět příslušná potravinářská aditiva na obalech potravin.

Z výčtu dnes používaných technik kapilární elektroforézy jsou pro stanovení přídavných látek nejvíce používány CZE a MEKC a obě techniky lze aplikovat na široké množství těchto látek. V poslední době je k analýze potravin využíváno i mikročipové kapilární elektroforézy [25]. Spolu s elektroforetickými technikami se využívají i metody chromatografické, spektrofotometrické a gravimetrické.

#### 3.1. Potravinářská barviva

Potravinářská barviva jsou organické látky, jejichž barevnost vzniká v důsledku tzv. chromoforů, přítomných v molekule barviva. Potravinářská barviva se dělí do dvou skupin, a to na přírodní a syntetická. Tato barviva se přidávají do potravin pro zdokonalení jejich zbarvení. Neměly by však nepříznivým způsobem ovlivňovat chuť a vůni potraviny. Mezi přirozená rostlinná barviva (pigmenty) patří např. flavonoidy, karotenoidy, chlorofyly a anthokyany. Flavonoidní látky se účastní hlavně na výsledné barevnosti ovoce, stejně jako barviva karotenoidní, která jsou přítomná rovněž v zelenině. Chlorofylová barviva se kontrolují při konzervaci zeleniny a anthokyany se vyskytují například v jahodách a



třešních. Rostlinná barviva lze bez zdravotního rizika využít i v kosmetice a farmacii. Jako barviva živočišného původu se využívají mimo jiné hemoglobin a myoglobin [26]. Hojně využívaným přírodním barvivem, přidávaným do nápojů i potravin, je karamel.

Syntetická barviva, používaná v potravinářském průmyslu, se dělí na barviva rozpustná ve vodě nebo v tucích. Některá syntetická barviva mají neblahý vliv na zdraví, a proto se v některých zemích k přibarvování potravin už nemohou využívat. Barvivo ponceau 4R (E124) je zakázáno v USA i ve Velké Británii, dále se barviva amarant (E123) a erythrosin (E127) nesmějí používat v USA. I když mají tato barviva prokázané negativní účinky na lidské zdraví, jejich používání je v České republice stále povoleno [27]. Přesto se množství přídatných barviv v potravinách přísně sleduje podle zákonných zdravotnických norem.

### **3. 1. 1. Stanovení potravinářských barviv**

#### **3. 1. 1. 1. Stanovení potravinářských barviv pomocí CZE**

Kuo a kol. analyzovali přítomnost syntetických barviv ve zmrzlině a v ovocných nápojích [28]. Pro strukturu těchto barviv byla charakteristická přítomnost sulfonových nebo karboxylových funkčních skupiny. Separace byla provedena v borátovém pufru (pH = 9,5) obsahujícím 5 mM  $\beta$ -cyklodextrinu. Analyzovaná barviva byla detekována pomocí DAD detektoru a doba analýzy nepřekročila 10 min.

Royle a kol. zkoumali pomocí CZE přítomnost a množství karamelových barviv IV. třídy v nealkoholických nápojích kolového typu [29]. Pro analýzu byl použit 50 mM fosfáto-borátový pufr o pH = 9,5 a UV detekce při 200 a 280 nm. Bylo zjištěno, že množství karamelu v nápojích se pohybovalo v rozmezí 0,57 – 0,82 mg/ml. Poté byla optimalizovaná metoda aplikována i na ostatní třídy (I a III) tohoto přírodního barviva [30].

Huang a kol. pomocí CZE analyzovali v ochucených ovocných mléčných nápojích sedm syntetických potravinářských barviv (žluť SY, červeň Allura AC, ponceau 4R, tartrazin, patentní modř V, brilantní modř a indigotin) a jedno přírodní (kyselina karmínová) [31]. Separace byla provedena v 15mM borátovém pufru o pH = 10,0

s přidavkem 7,0 mM  $\beta$ -cyklodextrinu, analýza trvala asi deset minut. Stejný autor pak použil tuto optimalizovanou metodu na stanovení stejných barviv ve vzorcích nápojů, mléka a cukrovinek [32].

Del Giovine a Piccioli-Bocca sledovali přítomnost tří syntetických barviv (žlutá SY – E110, azorubin – E122 a ponceau 4R – E124) ve zmrzlině [33]. K analýze použili CZE s DAD detekcí s využitím směsného 25 mM fosfátového a 25 mM borátového pufru o pH = 8,0 jako pracovního elektrolytu, přičemž doba separace trvala pouhých 6 min.

Ryvolová a kol. použila CZE s laser-indukovanou fluorescenční detekcí (LIF) při 532 nm ke stanovení červených potravinářských barviv (amarant, ponceau 4R, erythrosin, červeň 2G a azorubin) v třešňovém sirupu a koktejlových třešňových plodech [34]. Pro separaci byl použit 20 mM fosfátový pufr o pH = 11,0. Výhodou spojení CZE-LIF byla vysoká citlivost detekce a minimalizace vlivu matrice. Jedná se o vůbec první aplikaci této detekční metody pro stanovení červených potravinářských barviv.

De Villiers a kol. [35] použili HPLC a CZE s diode-array detekcí pro stanovení dvou syntetických potravinářských barviv (brilantní modř a azorubín) ve vzorcích červeného vína. CZE se při porovnání s výsledky dosaženými pomocí HPLC jeví jako dobrá alternativní metoda pro stanovení obou barviv v reálných vzorcích i přes to, že poskytuje poněkud vyšší detekční limity pro obě barviva.

Seifar a kol. [36] stanovili tři kyselá barviva pomocí CZE ve spojení s Ramanovou spektroskopií. Separovaná barviva byla detekována při 514,5 nm argonového laseru. Stejnou metodu detekci při CZE stanovení tří záporně nabitých potravinářských barviv použili i Arráez-Román a kol. [37].

Kapilární zónová elektroforéza v mikročipovém provedení byla použita Dossim a kol. ke stanovení dvou syntetických potravinářských barviv (zeleň S a patentní modř) v nealkoholických nápojích a cukrovinkách [38]. Analyzovaná barviva byla detekována amperometricky.

CZE ve spojení s MS a UV/VIS detekcí byla aplikována na stanovení přírodních barviv, flavonoidů a antrachinonů [39]. Kvůli MS detekci musel být použit jako pracovní elektrolyt těkavý 40 mM octan amonný o pH = 9,5. V porovnání s UV/VIS detekcí bylo u MS dosaženo nižší meze stanovitelnosti.

### 3. 1. 1. 2. Stanovení potravinářských barviv pomocí MEKC a CEC

Stanovením jedenácti potravinářských barviv v cukrovinkách a v instantních nápojích s ovocnými příchutěmi pomocí MEKC s DAD detekcí v borátovém pufru (pH = 10,1) s přísávkem 10 mM polyoxyethylen-23-lauryletheru (Brij 35) se zabývali Jager a kol. [40]. Tato barviva studovali pomocí MEKC-UV/VIS i Prado a kol., a to v alkoholických nápojích (víno a lihoviny). Pro vlastní separace použili fosfátový pufr s přísávkem 10 mM SDS [41].

Mejia a kol. [42] a Liu a kol. [43] analyzovali sudanová barviva (Sudan I – IV) přítomná v pálivých chilli kořenech z několika zemí. První kolektiv použil ke stanovení MEKC s UV detekcí a 5 mM borátového pufru o pH = 9,3 s přísávkem 20 mM SDS a 20% acetonitrilu (ACN), kdy doba potřebná k rozdělení analyzovaných látek trvala 15 min. Naproti tomu druhý kolektiv použil k analýze CEC s amperometrickou detekcí a na 20 cm separační kapiláře naplněné 1.5  $\mu\text{m}$  neporézními částicemi  $\text{C}_{18}$  stacionární fáze a při použití směsné mobilní fáze ACN – voda (95:5) s přísávkem kyseliny mravenčí bylo dosaženo velmi rychlé separace v časech do cca 7 min.

Patnáct syntetických potravinářských barviv analyzovali Jaworska a kol. pomocí MEKC s UV detekcí při vlnové délce 210 nm [44]. Obdobná syntetická barviva byla stanovena ve vzorcích sirupů, limonád, instantních nealkoholických nápojů, vín, bonbonů a pudinků pomocí MEKC-DAD a HPLC [45,46]. Separace byla provedena ve 12,5 mM borátovém-fosfátovém pufru (1:1) o pH = 9,0 s přísávkem SDS.

## 3. 2. Antioxidanty

Antioxidanty jsou potravinářská aditiva přidávána za účelem zvýšení trvanlivosti potraviny, pro déle trvající chuť a stabilní zbarvení [47]. Jejich úloha spočívá v inhibici oxidačních procesů, které mohou nastat u tuků, aminokyselin a u několika druhů vitamínů. V potravinářství se využívají antioxidanty přírodní nebo syntetické.

Nejznámějším přírodním antioxidantem je vitamin C (kyselina askorbová), který je obsažen nejen v citrusech, ale především v šípčích, brokolici a černém rybízu. Velmi často

je přidáván do nealkoholických nápojů. Stanovit obsah celkového vitamínu C lze pomocí CE technik nebo kapalinovou chromatografií s UV i fluorescenční detekcí. Vitamín E (tokoferol) je rovněž řazen mezi přírodní antioxidanty. Nachází se například v burských oříšcích, ve slunečnicových semenech a v mase savců. V rostlinném oleji plní funkci konzervační látky. Vitamín E je jedním ze čtyř vitamínů rozpustných v tucích. Mezi syntetické antioxidanty patří estery kyseliny gallové, butylhydroxyanizol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT) a *terc*-butylhydrochinon (BHQ). Z elektromigračních technik jsou k analýze antioxidantů nejvíce vhodné CZE a MEKC [24].

### **3. 2. 1. Stanovení antioxidantů**

#### **3. 2. 1. 1. Stanovení antioxidantů pomocí CZE a CITP**

Sádecká a kol. pomocí CITP s vodivostní (konduktometrickou) detekcí zjišťovali přítomnost kyseliny askorbové a jiných přídatných látek v nápojích (pivo, ovocné šťávy) a masných výrobcích [48]. Vedoucí elektrolyt o pH = 3,0 se skládal z 10 mM kyseliny chlorovodíkové, β-alaninu a 0,1% methylhydroxyethylcelulózy, koncový elektrolyt obsahoval 5 mM kyselinu kapronovou.

CZE byla použita k analýze devíti nejčastěji se vyskytujících flavonoidů ve víně [49]. Wangovi a Juangovi se v 35 mM borátovém pufru o pH = 8,9 a při vlnové délce detekce 205 nm podařilo úspěšně rozdělit všechny sledované látky a metoda byla použita pro analýzu reálných vzorků vína po předchozí extrakci.

Spanilá a kol. [50] se zabývali optimalizací extrakce resveratrolu ze vzorků bílých a červených australských vín pomocí SPE a jeho následné stanovení pomocí CZE. Za optimalizovaných extrakčních a elektroforetických podmínek (25 mM borátový pufr o pH = 9,38) bylo dosaženo nízké hodnoty detekčního limitu 0,26 mg/l.

Kapilární zónová elektroforéza byla rovněž použita pro stanovení polyfenolických látek ve vzorcích italských extra panenských olivových olejů [51]. Vlastní separace etanolových extraktů vzorků olejů byla provedena v 45mM tetraboritanovém pufru o pH = 9,6 a z naměřených dat byly vyhodnoceny a porovnány antioxidační účinky jednotlivých olejů.

Pro ultra rychlé analýzy přírodních antioxidantů byla s úspěchem použita technika CZE-ED na mikročipu, a to pro analýzu fenolických látek ve víně [52] a rovněž také pro stanovení kyseliny askorbové a arbutinu ve vzorcích ovocných džusů [53].

### 3. 2. 1. 2. Stanovení antioxidantů pomocí MEKC a CEC

Delgado-Zamarreno a kol. [54] navrhli MEKC stanovení šesti nejběžnějších syntetických antioxidantů (BHA, BHT, BHQ, PG, OG, DG). Jednotlivé látky byly rozděleny během 15 min za použití bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinátu sodného (AOT) jako pseudo-stacionární fáze.

Guan a kol. sledovali množství syntetických antioxidační látek přítomných ve vzorcích rostlinných olejů a instantních polévek [55]. Stanovení bylo provedeno pomocí MEKC v 20 mM borátovém pufru (pH = 7,4) s přidavkem 25 mM SDS. Použitím amperometrické detekce se pak zajistilo zvýšení citlivosti detekčních limitů sledovaných antioxidantů.

Flavonoidním látkám v různých druzích vína se věnovali Rodriguez–Delgado a kol. [56]. Technikou MEKC–DAD v pracovním elektrolytu o vyšší koncentraci (150 mM borátový pufr o pH = 8,5) s přidavkem 50 mM SDS a malým množstvím methanolu se podařilo stanovit analyzované flavonoidy.

Boyce a Spickett analyzovali pomocí MEKC směs devíti přírodních i syntetických antioxidantů, povolených v Austrálii, ve vzorcích sezamového oleje a vína [57]. Pro separaci byl použit 10 mM borátový pufr o pH = 9,3 s přidavkem 15 mM SDS a 10% methanolu.

Aturki a kol. [58] použili CEC pro stanovení tokoferolu ve vzorcích slunečnicového, sojového, ořechového a olivového oleje. Pro separaci byla použita velmi krátká kapilára, čímž bylo dosaženo velmi malých časů analýzy (cca 2,5 min.).

Optimalizací CEC separace  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - a  $\delta$ - tokoferolu se zabývali Carabias-Martinez a kol., kdy testovali nově vyvinuté polární stacionární fáze v porovnání s konvenčními  $C_{18}$  fázemi [59].

Herrero-Martínez a kol. využili CEC k analýze karotenoidů ve vzorcích listové zeleniny [60]. Kapilára byla naplněna  $C_{18}$  stacionární fází Hypersil ODS. Nejlepší separace bylo dosaženo v mobilní fázi skládající se ze směsi acetonitrilu, tetrahydrofuranu a Tris

(60:35:5) a v porovnání s HPLC bylo i přes kratší dobu analýzy dosaženo výrazně lepší separační selektivity.

### **3. 3. Sladidla**

Umělá sladidla se používají pro slazení potravin, zejména pro výrobu diabetických produktů, čímž nahrazují klasický cukr [24]. Rozeznávají se dva druhy umělých sladidel, intenzivní a objemová. Běžnými intenzivními sladidly jsou aspartam, acesulfam K, cyklamáty, sacharin a dulcin. Již malé množství poskytuje značnou sladkost. Objemovými nízkoenergetickými sladidly mohou být sorbitol, manitol a laktitol. Dříve se tyto přídavné látky stanovovali pomocí HPLC, nyní se více využívá technik kapilární elektroforézy, zejména CZE.

#### **3. 3. 1. Stanovení sladidel**

Stroka a kol. [61,62] použili CZE s nepřímou UV detekcí pro kontrolní sledování množství umělého sladidla sukralózy v ovocných nápojích a jogurtech. Po předchozí extrakci tuhou fází (SPE) byla provedena derivatizace s 3 mM 3,5-dinitrobenzoovou kyselinou a následná CZE separace. Ukázalo se, že obsah sladila v analyzovaných vzorcích byl nižší než povolená norma (běžně 200–400 mg/kg v rámci EU).

Horie a kol. [63] zjišťovali ve džemu, nakládané zelenině a cukrovinkách přítomnost cyklamátů. Po úpravě vzorků pomocí SPE byla opět využita CZE s nepřímou UV detekcí v přítomnosti 10 mM sorbanu draselného. Mez stanovitelnosti zjištěných cyklamátů se pohybovala v rozmezí 5-10 mg/g.

Nikolelis a Pantoulis [64] se zabývali CZE analýzou směsi umělých sladidel (acesulfam-K, cyklamáty a sacharin) ve vzorcích jogurtů s ovocnou příchutí, ovocných nealkoholických nápojů a vín.

### 3. 4. Konzervační látky

Konzervační látky slouží ke konzervaci potravin, zajišťují jejich déle trvající chuť, vůni a vzhled. Konzervanty zvyšují trvanlivost výrobku, protože potraviny snadno podléhají zkáze vlivem oxidace, tepla, světla, mikroorganismů, a proto je cílem používání konzervantů zamezit působení chemických, fyzikálních a biologických procesů. Jako příklady těchto látek lze uvést kyselinu sorbovou, kyselinu benzoovou, estery kyseliny *p*-hydroxybenzoové, oxid siřičitý, sirné sloučeniny, dusičnany a dusitany [24,47]. Bývají přidávány do nealkoholických nápojů, vín, sýrů, džemů, sušeného ovoce, ovocných šťáv i masných výrobků. Proces konzervace se může realizovat i v průběhu technologického postupu při zpracování potraviny.

#### 3. 4. 1. Stanovení konzervačních látek

Stanovením siřičitanů a organických kyselin ve víně se zabývali Saavedra a Barbas [65]. Za použití CZE s přímou UV detekcí při 200 nm byla v 200 mM fosfátovém pufru (pH = 7,5) provedena separace během 13 min. na kapiláře s pokrytým vnitřním povrchem polyakrylamidovou vrstvou.

Rovněž Masár a kol. zkoumali možnosti stanovení volných siřičitanů ve víně, a to pomocí mikročipové ITP-CZE s vodivostní detekcí [66]. Před CZE analýzou bylo nutné siřičitany převést na hydroxymethansulfonát pro minimalizaci ztrát vlivem oxidace a současně s tímto online ITP krokem proběhlo odstranění matrice vzorku.

Dobiášová a kol. [67] použili CZE s UV detekcí v prostředí 25mM borátového pufru o pH = 9,5 ke stanovení kyseliny sorbové ve vzorcích alsaských a francouzských bílých a červených vín. Před vlastní analýzou bylo nezbytné provést prekoncentraci analyzovaných vzorků.

CZE stanovením kyseliny sorbové současně s kyselinou askorbovou (vitamín C) ve vzorcích ovocných džusů se zabývali Tang a Wu [68]. Separace byla provedena v borátovém pufru (80mM kyselina boritá ve směsi s 5 mM tetraboritanem sodným) o pH = 8,0.

Huang a kol. [69,70] popsali stanovení pěti konzervačních látek (tři parabenzeny, kyselina sorbová a kyselina benzoová) ve vzorcích sojových omáček a vína pomocí CEC na methakrylátových monolitických kolonách. Před vlastní analýzou byly vzorky zakoncentrovány pomocí SPE a vlastní CEC separace byla provedena za použití dihydrogenfosfátu sodného o  $\text{pH} = 3,0$  s přídavkem 65 % ACN.

Dusičnany a dusitany se často přidávají do masa pro zlepšení chuti, stabilizaci barvy a snížení rizika kažení. Oztekin a kol. popsali jejich stanovení ve vzorcích klobás, šunky a salámů s použitím CZE na pokryté kapiláře tak, aby se eliminoval vliv EOF [71]. K analýze byl použit 20 mM Tris pufr o  $\text{pH} = 7,5$ .



## 4. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá stručným popisem v současné době používaných technik kapilární elektroforézy, mezi které řadíme kapilární zónovou elektroforézu, kapilární izotachoforézu, micelární elektrokinetickou chromatografii, kapilární elektrochromatografii, kapilární gelovou elektroforézu a kapilární izoelektrickou fokusaci. Společným znakem všech uvedených technik je i přes rozdílný mechanismus separace jejich kapilární formát. I přes některé nevýhody (citlivost, reprodukovatelnost) se tyto elektroforetické techniky zařadily mezi rutinní nástroje používané pro separace v kapalně fázi a našly široké použití v oblastech chemie, biologie, farmacie, lékařství ale i zemědělství a životního prostředí.

Práce se dále zabývá možným využitím výše uvedených CE technik k analýze a stanovení potravinářských aditiv. Pojem potravinářská aditiva je totiž v poslední době stále více aktuální. Lze konstatovat, že se zvyšuje zájem veřejnosti o zdravý životní styl, v němž hraje důležitou roli výživa. Potravinářské výrobky spolu s dalšími faktory podstatně ovlivňují lidské zdraví a nepochybně i délku života. Při jejich výběru je důležité sledovat obsah přídatných látek, zvláště potravinářských barviv, antioxidantů, sladidel a konzervantů. Množství těchto látek v potravinách je stanoveno limitními množstvími a právě zde pak moderní analytické instrumentální metody a mezi nimi i kapilární elektroforetické techniky nacházejí své uplatnění.

## 5. Seznam použité literatury

- [1] F. Kvasnička, *Electrophoresis*, 28 (2007) 3581.
- [2] F. Kohlraush, *Ann. Phys. Chem.*, 62 (1897) 209.
- [3] A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.*, 33 (1937) 524.
- [4] S. Hjertén, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967) 122.
- [5] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.
- [6] S. F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis – Principles, Practice and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [7] J. P. Landers (Ed.), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, 1994.
- [8] M. G. Khaledi, *High-Performance Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [9] K. Štulík, *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha, 2004.
- [10] D. N. Heiger: *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard, Waldbronn, 1992.
- [11] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, Pavel Klouda s.r.o., Ostrava, 2003.
- [12] V. Kašička, *Chem. Listy*, 91 (1997) 320.
- [13] J. Zýka a kol., *Analytická příručka, díl II.*, SNTL/ALFA, Praha, 1980.
- [14] C. Haber, W. R. Jones, J. Soglia, M. A. Surve, M. McGlynn, J. R. Reineck, C. Krstanovic, *J. Capillary Electrophoresis*, 3 (1996) 1.
- [15] J. Preisler, F. Foret, B. L. Karger, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 5278.
- [16] V. Staněk, *Disertační práce*, Univerzita Pardubice, Pardubice, 2001.
- [17] P. Boček, M. Deml, P. Gebauer, V. Dolník, *Analytická kapilární izotachoforéza*, Academia, Praha, 1987.
- [18] J. Churáček a kol., *Analytická separace látek*, SNTL, Praha 1990.
- [19] R. Bodor, M. Žúborová, E. Ölvecká, V. Madajová, M. Masár, D. Kaniansky, B. Stanislawski, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 802.
- [20] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchuya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.
- [21] Z. Deyl, F. Švec (Eds.), *Capillary Electrochromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [22] V. Dolník, *Úvod do kapilární elektroforézy*, ÚIACH AV ČR, Brno, 1994.

- [23] C. Vidal-Valverde, I. Sierra, C. Díaz-Pollán, I. Blázquez, *Electrophoresis*, 22 (2001) 1479.
- [24] M. C. Boyce, *Electrophoresis*, 22 (2001) 1447.
- [25] A. Escarpa, M. C. González, A. G. Crevillén, A. J. Blasco, *Electrophoresis*, 28 (2007) 1002.
- [26] J. Davídek a kol., *Laboratorní příručka analýzy potravin*, SNTL/ALFA, Praha, 1981.
- [27] A. Šlampová, D. Smělá, A. Vondráčková, I. Jančářová, V. Kubáň, *Chem. Listy*, 95 (2001) 163.
- [28] L. K. Kuo, H. Y. Huang, Y. Z. Hsieh, *Chromatographia*, 47 (1998) 249.
- [29] L. Royle, J. M. Ames, L. Castle, H. E. Nursten, C. M. Radcliffe, *J. Sci. Food Agric.*, 76 (1998) 579.
- [30] L. Royle, C. M. Radcliffe, *J. Sci. Food Agric.*, 79 (1999) 1709.
- [31] H. Y. Huang, Y. C. Shih, *J. Chromatogr. A*, 959 (2002) 317.
- [32] H. Y. Huang, C. W. Chiu, S. L. Sue, C. F. Cheng, *J. Chromatogr. A*, 995 (2003), 29.
- [33] L. Del Giovine, A. Piccioli Bocca, *Food Control*, 14 (2003) 131.
- [34] M. Ryvolová, P. Táborský, P. Vrábel, P. Krásenský, J. Preisler, *J. Chromatogr. A*, 1141 (2007) 206.
- [35] A. De Villiers, F. Alberts, F. Lynen, A. Crouch, P. Sandra, *Chromatographia*, 58 (2003) 393.
- [36] R. M. Seifar, R. J. Dijkstra, A. Gerssen, F. Arbese, U. A. Th. Brinkman, C. Gooijer, *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 814.
- [37] D. Arráez-Román, E. Efremov, F. Ariese, A. Segura-Carretero, C. Gooijer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 180.
- [38] N. Dossi, R. Toniolo, A. Pizzariello, S. Susmel, *J. Electroanal. Chem.*, 601 (2007) 1.
- [39] I. Surowiec, K. Pawelec, M. Rezeli, F. Kilar, M. Trojanowicz, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2457.
- [40] A. V. Jager, F. G. Tonin, M. F. M. Tavares, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 957.
- [41] M. A. Prado, L. F. Vilas Boas, M. R. Bronze, H. T. Godoy, *J. Chromatogr. A*, 1136 (2006) 231.
- [42] E. Mejia, Y. Ding, M. F. Mora, C. D. García, *Food Chem.*, 102 (2007) 1027.
- [43] S. Liu, X. Zhang, X. Lin, X. Wu a kolektiv, *Electrophoresis*, 28 (2007) 1696.

- [44] M. Jaworska, Z. Szulinska, M. Wilk, E. Anuszevska, *J. Chromatogr. A*, 1081 (2005) 42.
- [45] A. Šlampová, I. Jančářová, D. Smělá, V. Kubáň, *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.*, 49 (2001) 7.
- [46] I. Jančářová, A. Vondráčková, A. Šlampová, V. Kubáň, *Czech. J. Food Sci.*, 18 (2000) 41
- [47] M. C. Boyce, *Electrophoresis*, 28 (2007) 4046.
- [48] J. Sádecká, J. Polonský, *Eur. Food Res. Technol.*, 211 (2001) 511.
- [49] S. P. Wang, K. J. Juang, *J. Chromatogr. A*, 1032 (2004) 273.
- [50] M. Spanilá, J. Pazourek, M. Farková, J. Havel, *J. Chromatogr. A*, 1084 (2005) 180.
- [51] M. Bonoli, M. Montanuccia, T. G. Toschi, G. Lercker, *J. Chromatogr. A*, 1011 (2003) 163.
- [52] M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, M. P. Chatrathi, *J. Chromatogr. A*, 1049 (2004) 189.
- [53] A. J. Blasco, I. Barrigas, M. C. González, A. Escarpa, *Electrophoresis*, 26 (2005) 4664.
- [54] M. M. Delgado-Zamarreno, A. Perez-Sanchez, I. Gonzalez-Maxa, J. Hernandez Mendez, *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 403.
- [55] Y. Guan, Q. Chu, L. Fu, T. Wu, J. Ye, *Food Chem.*, 94 (2006) 157.
- [56] M. A. Rodriguez-Delgado, J. Perez, M. J. Sánchez, F. J. García-Montelongo, *Chromatographia*, 52 (2000) 289.
- [57] M. C. Boyce, E. E. Spickett, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1970.
- [58] Z. Aturki, G. D'Orazio, S. Fanali, *Electrophoresis*, 26 (2005) 798.
- [59] R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, N. W. Smith, L. Ruano-Miguel, *Electrophoresis*, 27 (2006) 4423.
- [60] J. M. Herrero-Martínez, S. Eeltink, P. J. Schoenmakers, W. T. Kok, G. Ramis-Ramos, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 660.
- [61] J. Stroka, N. Dossi, E. Anklam, *Food Addit. Contam.*, 20 (2003) 524.
- [62] J. McCourt, J. Stroka, E. Anklam, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 1269.
- [63] M. Horie, F. Ishikawa, M. Oisha, T. Shindo, A. Yasui, K. Ito, *J. Chromatogr. A*, 1154 (2007) 423.
- [64] D. P. Nikolelis, S. Pantoulias, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5945.
- [65] L. Saavedra, C. Barbas, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2235.

- [66] M. Masár, M. Damková, E. Ölvecká, A. Stachurová, D. Kaniansky, B. Stanislawski, *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 31.
- [67] Z. Dobiášová, J. Pazourek, J. Havel, *Electrophoresis*, 23 (2002) 263.
- [68] Y. Tang, M. Wu, *Talanta*, 65 (2005) 794.
- [69] H. Y. Huang, C. L. Chuang, C. W. Chui, J. M. Yeh, *Food Chem.*, 89 (2005) 313.
- [70] H. Y. Huang, C. W. Chui, Y. I. Huang, J. M. Yeh, *Electrophoresis*, 25 (2004) 3237.
- [71] N. Oztekin, M. S. Nutku, F. B. Erim, *Food Chem.*, 76 (2002) 103.