VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ POLARIMETRIE A REFRAKTOMETRIE KE STANOVENÍ KONCENTRACE INVERTNÍHO CUKRU V INVERTNÍCH SIRUPECH

USE OF POLARIMETRY AND REFRACTOMETRY FOR DETERMINATION OF INVERT SUGAR CONCENTRATION IN INVERT SYRUPS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Bc. Karolína Mrůzková
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — Ing. Roman Hamtil, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2021

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ

Zadání diplomové práce

Číslo práce:	FCH-DIP1559/2020	Akademický rok:	2020/21
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Studentka:	**Bc. Karolína Mrůzková**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin		
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie		
Vedoucí práce:	**Ing. Roman Hamtil, Ph.D.**		

Název diplomové práce:

Využití polarimetrie a refraktometrie ke stanovení koncentrace invertního cukru v invertních sirupech

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše, ve které bude konkrétně popsáno následující:
– charakteristika invertních sirupů a jejich využití
– výroba invertních sirupů
– možnosti stanovení koncentrace invertního cukru v invertních sirupech
2. Příprava škály směsných roztoků fruktózy, glukózy a sacharózy v různých poměrech jednotlivých cukrů.
3. Charakterizace připravených roztoků z hlediska inverze, refraktometrické sušiny a polarizace.
4. Návrh matematického modelu vyjadřující korelaci inverze, refraktometrické sušiny a polarizace na základě změřených hodnot, který by sloužil k výpočtu inverze pomocí naměřených hodnot polarizace a refraktometrické sušiny.
5. Vyzkoušet navržený matematický model na vyrobených invertních sirupech a porovnat výsledky inverze s výsledky inverze získané pomocí HPLC/RI.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Karolína Mrůzková student(ka)	Ing. Roman Hamtil, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Invertní sirup je tekuté sladidlo, které se vyrábí hydrolýzou sacharózy na fruktózu a glukózu. Důležitým kvalitativním parametrem invertních sirupů je tzv. stupeň inverze – hmotnostní procento invertního cukru (suma fruktózy a glukózy) v sušině invertního sirupu. Tato diplomová práce se zabývá možností stanovení stupně inverze pomocí polarimetrie v kombinaci s refraktometrií v invertních sirupech o sušině 70–78 % vyrobených pomocí kyselé hydrolýzy při teplotě 80 °C a pH 2,4. Byl navržen nový empirický vztah popisující závislost stupně inverze na polarizaci a refraktometrické sušině. Výsledky stanovení stupně inverze pomocí nově navrženého vztahu byly srovnány s výsledky stanovení pomocí HPLC/RI jakožto referenční metody. Rozdíl výsledků stupně inverze získaných pomocí HPLC/RI a refraktometricko-polarimetrického stanovení dle nově navrženého vztahu byl stanoven na 0,1 ± 0,5 %. Při navrhování tohoto vztahu bylo vzato v potaz, že při daných výrobních podmínkách vzniká při hydrolýze sacharózy více glukózy než fruktózy. Poměr vznikající koncentrace fruktózy ku koncentraci glukózy byl stanoven na 0,96 ± 0,02.

ABSTRACT

Invert syrup is a liquid sweetener, which is produced by sucrose hydrolysis to form fructose and glucose. Important qualitative parameter of invert syrup is the sucrose inversion – weight percentage of invert sugar (sum of fructose and glucose) in invert syrup dry mass. This diploma thesis presents a possibility of sucrose inversion determination by polarimetry in combination with refractometry in invert syrups of 70–78 % dry mass produced at 80 °C and pH 2,4. New relationship describing the sucrose inversion as a function of polarization and refractometric dry mass was determined. The results of sucrose inversion determined using this new relationship were compared to results obtained by HPLC/RI, which was used as a reference method. The difference between these 2 determination methods was 0,1 ± 0,5 %. The new relationship was detemined with reference to the fact, that under the processing conditions, more glucose than fructose is formed. The fructose : glucose concentration ratio formed under processing conditions was observed to be equal 0,96 ± 0,02.

KLÍČOVÁ SLOVA

Invertní cukr, invertní sirup, inverze, hydrolýza sacharózy, stanovení invertního cukru, stupeň inverze, polarimetrie, refraktometrie, kapalinová chromatografie

KEYWORDS

Invert sugar, invert syrup, inversion, sucrose hydrolysis, invert sugar determination, sucrose inversion, polarimetry, refractometry, liquid chromatography

MRŮZKOVÁ, Karolína. *Využití polarimetrie a refraktometrie ke stanovení koncentrace invertního cukru v invertních sirupech.* Brno, 2021. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131317. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Roman Hamtil.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Bc. Karolína Mrůzková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Ing. Romanu Hamtilovi, Ph.D. a své konzultantce doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. za odborné vedení a přátelský přístup. Dále bych chtěla také poděkovat společnosti E D & F Man Ingredients s.r.o. za poskytnutí zázemí a cenných informací při zpracování experimentální a teoretické části této diplomové práce.

OBSAH

1 ÚVOD 7
2 TEORETICKÁ ČÁST 8
2.1 Charakteristika a využití invertních sirupů 8
2.1.1 Fyzikální vlastnosti invertních sirupů 9
2.1.2 Chemické vlastnosti invertních sirupů 12
2.2 Kyselá hydrolýza sacharózy 15
2.2.1 Mechanismus kyselé hydrolýzy sacharózy 15
2.2.2 Kinetika kyselé hydrolýzy sacharózy 17
2.3 Výroba invertních sirupů pomocí kyselé hydrolýzy 18
2.4 Možnosti stanovení koncentrace invertního cukru v invertních sirupech 18
2.4.1 Titrační stanovení 18
2.4.2 UV-VIS spektroskopie 19
2.4.3 Blízká infračervená (NIR) spektroskopie 19
2.4.4 Enzymatické stanovení 20
2.4.5 Kapalinová chromatografie 20
2.4.6 Polarimetrie 20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 22
3.1 Použité vybavení a chemikálie 22
3.1.1 Vybavení pro kapalinovou chromatografii 22
3.1.2 Ostatní vybavení 22
3.1.3 Chemikálie 22
3.2 Použité analytické metody 23
3.2.1 Stanovení refraktometrické sušiny 23
3.2.2 Stanovení polarizace 23
3.2.3 Stanovení pH 23
3.2.4 Kapalinová chromatografie – stanovení stupně inverze 23
3.3 Použité statistické vyhodnocení 24
3.3.1 Výběrová směrodatná odchylka 24
3.3.2 Přesnost metody 24

3.3.3 Bland-Altmanův graf ... 24
3.4 Popis výroby invertních cukrů ve firmě EDFMI ... 26
3.5 Popis experimentu ... 27
3.5.1 Statistické vyhodnocení přesnosti metody HPLC/RI ... 27
3.5.2 Stanovení invertního cukru v invertních sirupech pomocí modifikace metody dvojité polarizace a srovnání výsledků s HPLC/RI metodou ... 27
3.5.3 Stanovení koncentrace cukrů v roztoku připraveného dle Clergeta a Herzfelda 28
3.5.4 Stanovení koncentrace cukrů v invertním sirupu připraveného za výrobních podmínek ... 29
3.5.5 Optimalizace stanovení invertního cukru v invertních sirupech pomocí polarizace a refraktometrie ... 30
3.5.6 Srovnání výsledků stanovení dle nově navrženého vztahu a HPLC/RI ... 30
4 VÝSLEDKY A DISKUZE ... 32
4.1 Statistické vyhodnocení přesnosti metody HPLC/RI ... 32
4.2 Stanovení invertního cukru v invertních sirupech pomocí modifikace dvojité polarizace a srovnání výsledků s HPLC/RI metodou ... 34
4.3 Koncentrace cukrů v roztoku připraveného dle Clergeta a Herzfelda ... 35
4.4 Koncentrace cukrů v invertním sirupu připraveného za výrobních podmínek ... 36
4.5 Optimalizace stanovení invertního cukru v invertních sirupech pomocí polarizace a refraktometrie ... 39
4.6 Statistické srovnání výsledků stanovení dle nově navrženého vztahu a pomocí HPLC/RI ... 44
5 ZÁVĚR ... 46
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ ... 48
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK ... 54
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ ... 55
9 SEZNAM POJMŮ ... 57
10 SEZNAM PŘÍLOH ... 58
11 PŘÍLOHY ... 59

1 ÚVOD

Analytických metod, které se ke stanovení invertního cukru v roztoku se sacharózou dají použít je celá řada – kapalinová chromatografie, titrační metody založené na redukci oxidačního činidla redukujícím invertním cukrem, enzymatické analytické metody nebo infračervená spektroskopie. Tyto metody jsou však buď časově náročné, komplikované na obsluhu, případně drahé, ať už z důvodu velkého množství používaných chemikálií či pořizovací ceny měřícího přístroje.

Firma E D & F Man Ingredients s.r.o. (EDFMI) pro účely stanovení stupně inverze v invertních sirupech využívá analytickou metodu založenou na měření refraktometrické sušiny a polarizace. Toto stanovení vychází ze stanovení sacharózy v přítomnosti jiných opticky aktivních látek pomocí dvojité polarizace dle Clergeta a Herzfelda. V rámci tohoto stanovení je však původní Clerget-Herzfeldova rovnice upravena za účelem zkrácení času analýzy. Neměří se proto v tomto případě hodnota polarizace před inverzí a po inverzi jako dle Clergeta a Herzfelda, pouze polarizace a refraktometrická sušina po inverzi.

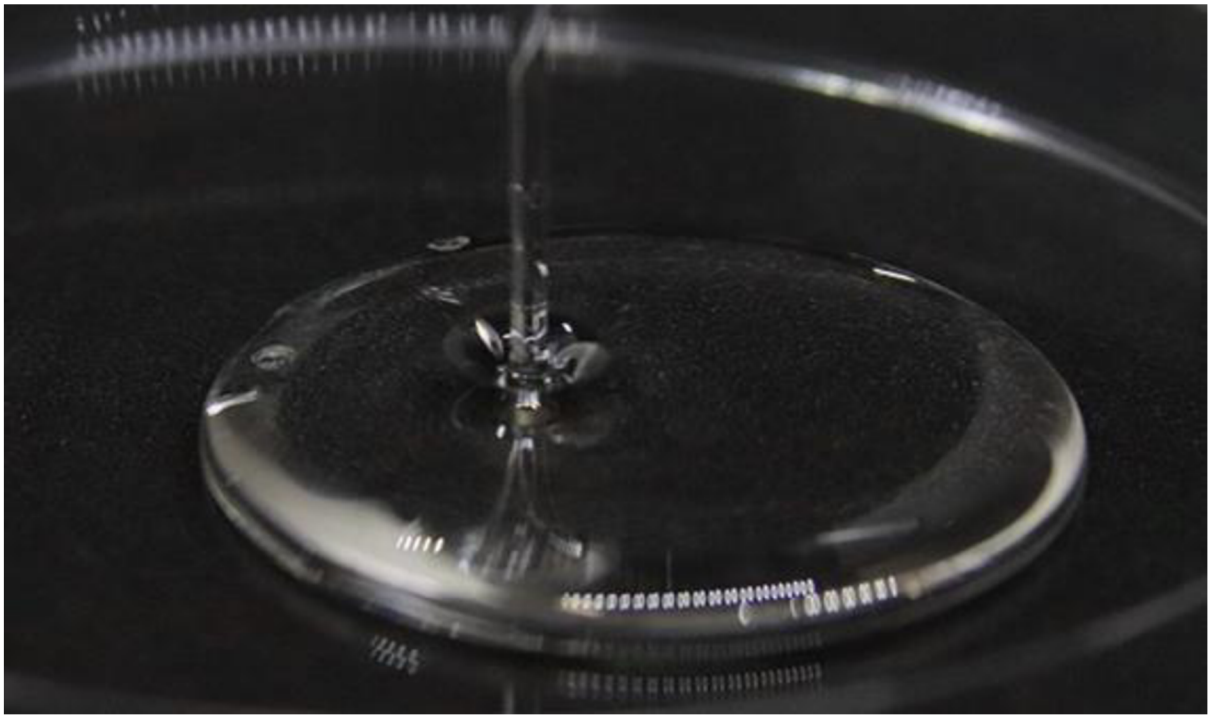
Tato upravená metoda je levná, jednoduchá na provedení, rychlá, a navíc nevyžaduje použití chemikálií. Na druhou stranu je nepřesná v porovnání s výsledky jiných metod, např. kapalinové chromatografie. Je to způsobeno tím, že Clerget-Herzfeldova rovnice vychází z hodnot polarizace změřených pro roztok s invertním cukrem, který byl hydrolyzován při koncentraci původní sacharózy 0,13 $g \cdot ml^{-1}$. V invertních sirupech je však koncentrace cukrů podstatně vyšší, což vede ke vzniku odlišného složení invertního cukru (poměr fruktózy a glukózy) v invertních sirupech oproti složení invertního cukru v roztoku připraveného dle Clergeta a Herzfelda. Tento odlišný poměr fruktózy a glukózy způsobuje rozdílné výsledky polarizace invertních sirupů oproti hodnotám, které byly použity pro stanovení Clerget--Herzfeldovy rovnice a z toho důvodu je stanovení stupně inverze v invertních sirupech pomocí Clerget-Herzfeldovy metody či její upravené verze, kterou používá EDFMI, nepřesné.

Tato diplomová práce se zabývá navržením nového vztahu popisujícího závislost stupně inverze na refraktometrické sušině a polarizaci invertních sirupů o sušině 70–78 % vyrobených pomocí kyselé hydrolýzy při teplotě 80 °C a pH 2,4. Hlavním cílem je, aby nově navržený vztah pro stanovení stupně inverze pomocí polarimetrie a refraktometrie byl přesnější než vztah, který EDFMI momentálně používá, ve srovnání s výsledky kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí (HPLC/RI). HPLC/RI je použita jako referenční stanovení především z toho důvodu, že se jedná o přesnou metodu, co se správnosti i preciznosti týče. Zároveň tuto metodu společnost EDFMI uvádí jako referenční pro stanovení stupně inverze v specifikacích svých výrobků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika a využití invertních sirupů

Invertní sirup je tekuté sladidlo viz Obr. 1, které se vyrábí hydrolýzou sacharózy na fruktózu a glukózu. Hydrolýza sacharózy se v cukrovarnictví nazývá inverze, a to z toho důvodu, že se během hydrolýzy sacharózy na fruktózu a glukózu otáčí rovina polarizovaného světla. Optická otáčivost čisté sacharózy má kladnou hodnotu, naopak optická otáčivost směsi fruktózy a glukózy, nazývané v cukrovarnictví běžně invertním cukrem, je záporná [1]. Pojem inverze pochází z latinského slova *inversio* [2] a jeho synonymy jsou obrat nebo převrácení [3].



Obr. 1: Vzhled invertního sirupu, autorka: Romana Davídková

Invertní sirup se využívá jako sladidlo ve velkém množství potravinářských výrobků. Oproti sacharóze je invertní cukr lépe rozpustný a tím pádem méně náchylný ke krystalizaci [4]. Díky lepší rozpustnosti lze připravit invertní sirup o větší sušině než tekutou sacharózu, což má za následek nižší aktivitu vody a vyšší osmotický tlak výrobku a tím lepší mikrobiologickou stabilitu a delší trvanlivost [5]. Invertní cukr je také hygroskopický. Této vlastnosti se zase využívá v pekařství, kde se invertní sirupy přidávají do pekařských výrobků za účelem udržení jejich vlhkosti po co nejdelší dobu [6]. Na trhu se vyskytují jak totální invertní sirupy, u kterých je sacharóza hydrolyzována zcela, tak i částečně hydrolyzované invertní sirupy, které obsahují i sacharózu [7].

2.1.1 Fyzikální vlastnosti invertních sirupů

Invertní cukr (ekvimolární směs fruktózy a glukózy) je lépe rozpustný než samotná sacharóza [4]. To je způsobeno vysokou rozpustností fruktózy, naopak glukóza má při teplotách pod 50 °C menší rozpustnost než sacharóza [8]. Experimentálně stanovené hmotnostní zlomky nasycených roztoků sacharózy, fruktózy a glukózy při 20 °C jsou uvedené v Tab. 1. Postupnou hydrolýzou sacharózy se díky fruktóze stává směs více rozpustná, v určitém stupni inverze rozpustnost invertního cukru dosáhne svého maxima a poté klesá kvůli zvyšující se koncentraci glukózy, která je méně rozpustná než sacharóza. *R. F. Jackson* [9] experimentálně stanovil, že maximální možná koncentrace rozpuštěných cukrů (sušina) v invertním sirupu při 30 °C je 79 %. Složení invertního sirupu o takovéto sušině bylo stanoveno na 45,4 % invertního cukru, 33,6 % sacharózy a 21 % vody. Jiné poměry invertního cukru a sacharózy tvořily méně nasycené roztoky při této teplotě [9].

Tab. 1: Hmotnostní procento celkových cukrů (w_{TS}) nasycených roztoků sacharózy, fruktózy a glukózy při 20 °C

w_{TS} [%]		
Sacharóza	**Fruktóza**	**Glukóza**
66,8 [10]	79,4 [11]	47,8 [12]
66,3 [13]	79,3 [14]	47,5 [15]

Sacharóza, glukóza i fruktóza jsou opticky aktivní látky, což znamená, že jejich roztoky mají schopnost otáčet rovinu polarizovaného světla [16]. Veličina vyjadřující optickou aktivitu se nazývá optická otáčivost (α). Optická otáčivost se měří pomocí polarimetru a je definovaná jako úhel, o který se otočí rovina polarizovaného světla při průchodu opticky aktivní látkou.

Tato veličina je závislá na koncentraci opticky aktivní látky v roztoku (c), vlnové délce polarizovaného světla (λ), teplotě měření (t) a délce kyvety (L), kterou polarizované světlo prochází. Opticky aktivní látky jsou charakterizovány pomocí měrné otáčivosti, což je hodnota optické otáčivosti při jednotkové délce kyvety (L = 1 dm) a jednotkové koncentraci (c = 1 g·ml^{-1}) a při dané teplotě a vlnové délce. Dle Boitova zákona (1) je pak možné dopočítat, jaká optická otáčivost bude pomocí polarimetru naměřena pro konkrétní koncentrace a délky kyvety při dané t a λ. Případně je možné z této rovnice spočítat koncentraci opticky aktivní látky v roztoku z naměřené optické otáčivosti, čehož se využívá v analytické chemii. Nejčastěji se měrná otáčivost udává pro t = 20 °C a λ = 589 nm (polarizované světlo sodíkového dubletu D), jakožto nejběžnější podmínky měření [17].

$$\alpha = [\alpha]_{\lambda}^{t} \cdot c_g \cdot L \quad [°] \qquad (1)$$

Vysvětlivky: α – optická otáčivost [°]; $[\alpha]_D^{20}$ – měrná optická otáčivost [°·ml·g^{-1}·dm^{-1}]; c_g – hmotnostní koncentrace cukru [g·ml^{-1}]; L – délka kyvety [dm]

Sacharóza a glukóza jsou pravotočivé, což znamená, že jejich optická otáčivost nabývá kladných hodnot. Fruktóza je oproti tomu významně levotočivá, její optická otáčivost je záporná. Hodnoty měrné otáčivosti vodných roztoků sacharózy, glukózy a fruktózy při teplotě 20 °C a vlnové délce 589 nm (D) jsou shrnuté v Tab. 2. [16]. Optická otáčivost invertního cukru je levotočivá. *W. C. Vogsburgh* [18] došel k závěru, že optická otáčivost roztoku invertního cukru se rovná polovině součtu optických otáčivostí roztoků fruktózy a glukózy o stejné koncentraci jako daný roztok invertního cukru [18].

Experimentálně bylo sice potvrzeno, že optická otáčivost fruktózy i sacharózy je přímo úměrná koncentraci daného cukru, což udává Boitův zákon viz rovnice (1) [19]. Existují však i data, která poukazují na to, že tomu tak není. Například *Y. Tsuzuki a spol.* [20] měřili optickou otáčivost pro různé koncentrace fruktózy ve vodě (5–40 %) a pro každou koncentraci dle naměřené optické otáčivosti vypočítali odlišnou měrnou otáčivost. Měrná otáčivost 5% a 40% roztoku fruktózy při 20 °C jim dle naměřených hodnot vyšla −92,49 °, resp. −97,11 °, což je skoro 5 ° rozdíl [20].

Tab. 2: Hodnoty měrné otáčivosti sacharózy, fruktózy, glukózy a invertního cukru [16]

$[\alpha]_D^{20}$ [°·ml·g^{-1}·dm^{-1}]		
Sacharóza	**Fruktóza**	**Glukóza**
+66,53	−92,4	+52,7

Vysvětlivky: $[\alpha]_D^{20}$ – měrná optická otáčivost α[°·ml·g^{-1}·dm^{-1}]

*Další fyzikální veličinou, kterou může být fruktóza, glukóza a sacharóza, respektive invertní cukr, charakterizovány je index lomu (*n*). Hodnota indexu lomu závisí na vlnové délce světla a na teplotě, tlaku a koncentraci látek [21]. Dle mezinárodní komise pro metody jednotných rozborů cukrů (ICUMSA) je index lomu při atmosférickém tlaku pro vodné roztoky sacharózy, glukózy, fruktózy a invertního cukru vyjádřen vztahem (2). Tento vztah platí pro koncentrace cukru 0–85 %, teplotu roztoku 20 °C a vlnovou délku světla 589,3 nm. Koeficienty a_1–a_6 jsou odlišné pro každý typ cukru, konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3. Pro představu, jaké hodnoty indexu lomu jsou pro jednotlivé cukerné roztoky charakteristické, jsou v*

Tab. 4 uvedené vypočtené hodnoty dle vztahu (2) pro koncentrace cukrů 65–85 % [22].

$$n = a_1 + a_2 w + a_3 w^2 + a_4 w^3 + a_5 w^4 + a_6 w^5 \qquad (2)$$

Vysvětlivky: n – index lomu měřený při atmosférickém tlaku; w – hmotnostní procento cukru v roztoku [%]

Tab. 3: Koeficienty pro vztah (2) [22]

Koeficient	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza	Invertní cukr
a_1	1,332 987 3	1,332 987 7	1,332 987 7	1,332 987 7
a_2	$1{,}427\,980 \cdot 10^{-3}$	$1{,}424\,484 \cdot 10^{-3}$	$1{,}411\,992 \cdot 10^{-3}$	$1{,}417\,012 \cdot 10^{-3}$
a_3	$5{,}438\,990 \cdot 10^{-6}$	$4{,}949\,600 \cdot 10^{-6}$	$5{,}226\,010 \cdot 10^{-6}$	$5{,}219\,200 \cdot 10^{-6}$
a_4	$1{,}305\,860 \cdot 10^{-8}$	$1{,}314\,570 \cdot 10^{-8}$	$6{,}371\,500 \cdot 10^{-9}$	$5{,}090\,290 \cdot 10^{-8}$
a_5	$1{,}203\,300 \cdot 10^{-10}$	$3{,}578\,380 \cdot 10^{-11}$	$2{,}234\,150 \cdot 10^{-10}$	$2{,}036\,970 \cdot 10^{-10}$
a_6	$-8{,}975\,400 \cdot 10^{-13}$	$-4{,}166\,100 \cdot 10^{-13}$	$-1{,}981\,700 \cdot 10^{-12}$	$-1{,}551\,000 \cdot 10^{-12}$

Tab. 4: Hodnoty indexu lomu roztoků sacharózy, glukózy, fruktózy a invertního cukru při 20 °C, atmosférickém tlaku a vlnové délce 589,3nm [22]

w [%]	Sacharóza	Glukóza	Fruktóza	Invertní cukr
65	1.453 5	1,450 3	1,450 3	1,450 3
70	1,465 5	1,461 6	1,461 7	1,461 8
75	1,477 9	1,473 4	1,473 3	1,473 5
80	1,490 7	1,485 5	1,485 3	1,485 6
85	1,504 0	1,497 9	1,497 5	1,498 0

Vysvětlivky: w – hmotnostní procento cukru v roztoku [%]

Jelikož je index lomu závislý na koncentraci dané látky, je možné pomocí měření indexu lomu stanovit velmi rychle koncentraci daného cukru v roztoku. Tato metoda se dá uplatnit pouze za podmínky, že se jedná o roztok jedné látky a běžně se používá pro stanovení obsahu sacharózy v cukerných roztocích. Refraktometricky stanovený obsah sacharózy se v potravinářství označuje spíše jako refraktometrická sušina [°Bx]. Obsahuje-li totiž roztok pouze jeden typ cukru jako například sacharózu, případně velmi malé množství jiných látek, je stanovená refraktometrická sušina velmi podobná reálné sušině. Čím více je použitá surovina znečištěna, tím méně refraktometrická sušina reálné sušině odpovídá [23].

V případě směsí invertního cukru a sacharózy vychází refraktometrická sušina (měřena dle závislosti indexu lomu na koncentraci sacharózy) nižší než reálný obsah cukrů (skutečná sušina). Je to způsobeno tím, že fruktóza a glukóza mají nižší index lomu než sacharóza, a tak přirozeně index lomu směsi snižují. Závislost rozdílu reálné sušiny a refraktometrické sušiny na hmotnostním procentu celkových cukru v roztoku a stupni inverze vyjadřuje dle ICUMSA vztah (3). Hodnoty koeficientů A, B, C, D, a E jsou uvedeny v Tab. 5. Tento vztah je platný pro hmotnostní procento celkových cukrů 0–85 % při teplotě měření 20 °C a vlnové délce 589,3 nm. Například u invertního sirupu obsahujícího 40 % invertního cukru, 40 % sacharózy a 20 % vody bude dle vztahu (3) naměřeno 79,03 °Bx, což je rozdíl 0,97 od reálné sušiny 80 % [22].

$$\Delta w = \left(A + Bw_{TS} + Cw_{TS}^2 + Dw_{TS}^3\right) w_{INV} + Ew_{INV}^2 \qquad (3)$$

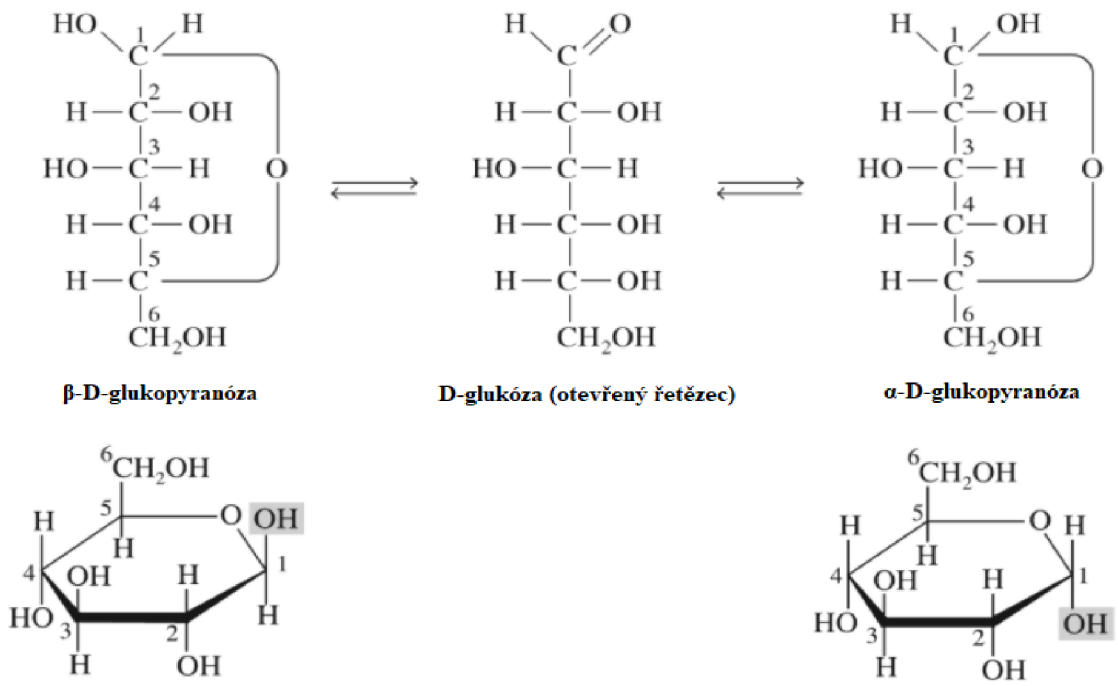
Vysvětlivky: Δw – rozdíl reálné sušiny a refraktometrické sušiny; w_{TS} – hmotnostní procento celkových cukru v roztoku [%]; w_{INV} – hmotnostní procento invertního cukru v roztoku [%]

Tab. 5: Koeficienty pro vztah (4) [22]

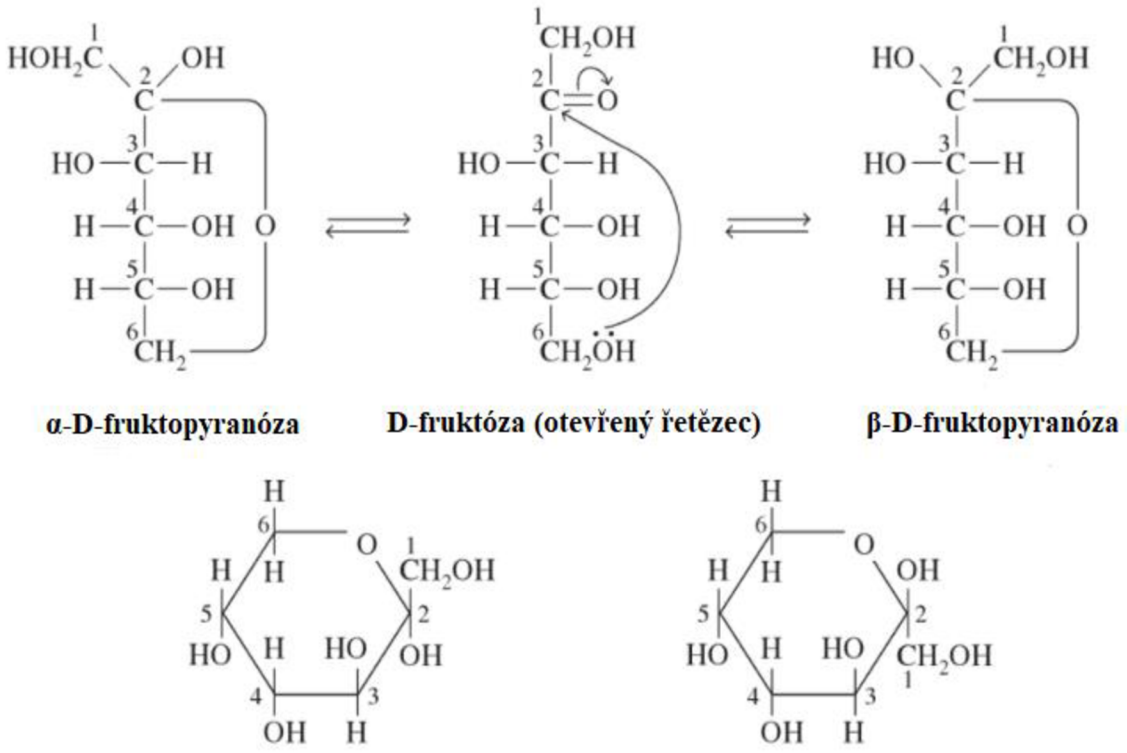
A	B	C	D	E
$6{,}222\,0 \cdot 10^{-3}$	$2{,}372\,5 \cdot 10^{-4}$	$-1{,}816\,5 \cdot 10^{-6}$	$1{,}890\,6 \cdot 10^{-8}$	$2{,}328\,0 \cdot 10^{-5}$

2.1.2 Chemické vlastnosti invertních sirupů

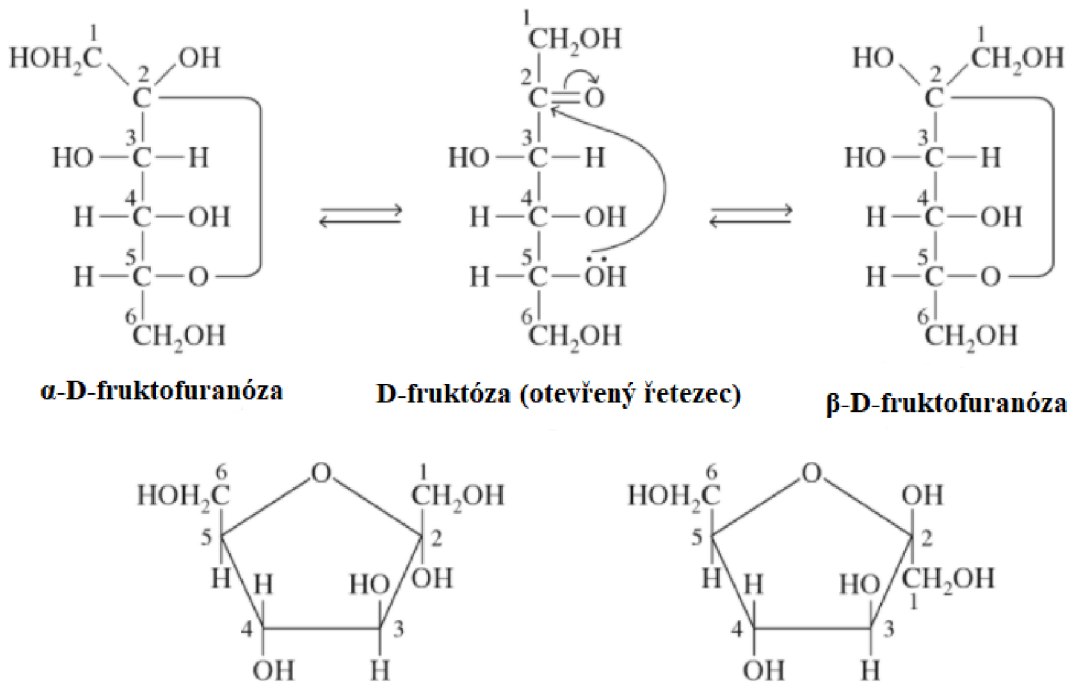
Invertní sirup obsahuje fruktózu, glukózu a vodu, případně sacharózu [7]. Fruktóza a glukóza jsou monosacharidy, konkrétně hexózy. Glukóza se řadí mezi tzv. aldózy – monosacharidy s aldehydovou skupinou a fruktóza zase mezi ketózy – monosacharidy s ketonovou skupinou. Glukóza a fruktóza se ve vodném roztoku vyskytují jak ve formě otevřeného řetězce, tak převážně ve stabilnější cyklické formě. Cyklická forma vzniká intramolekulární reakcí mezi karbonylovou a hydroxylovou skupinou řetězce. Glukóza existuje ve vodném roztoku převážně jako šestičlenná pyranóza, která vzniká reakcí aldehydové skupiny na C1 a hydroxylové skupiny na C5 viz Obr. 2. Fruktóza naopak ve vodném roztoku tvoří, jak pyranózový cyklus viz Obr. 3, tak pětičlenný furanózový cyklus, který vzniká reakcí ketoskupiny na C2 a hydroxylové skupiny na C5 viz Obr. 4 [24].



Obr. 2: Mutarotace D-glukózy [25]



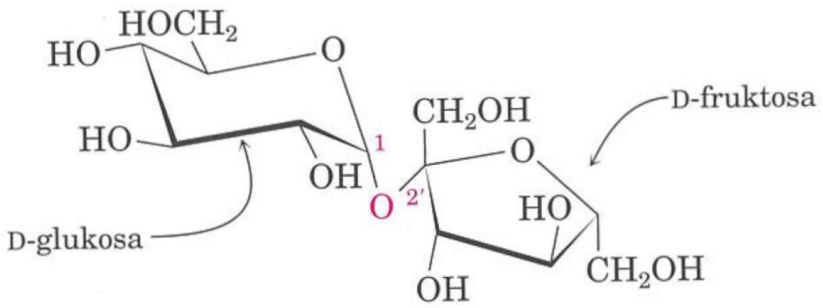
Obr. 3:Mutarotace D-fruktózy – pyranózová forma [25]



Obr. 4: Mutarotace D-fruktózy – furanózová forma [25]

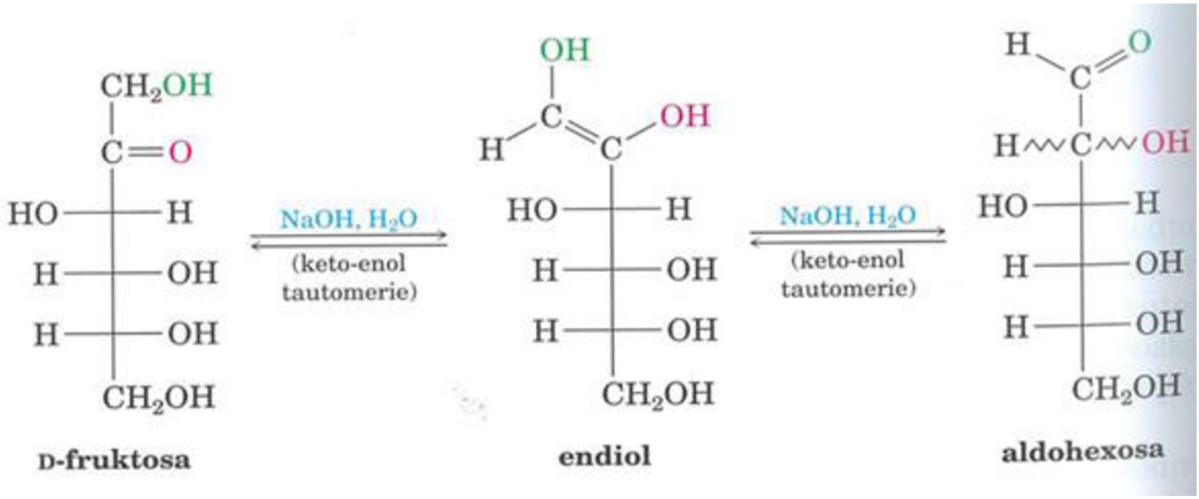
Při cyklizaci monosacharidů mohou vznikat dva odlišné stereoisomery (α-anomer a β-anomer). Tento jev se nazývá mutarotace. Vzniklé anomery se liší polohou hydroxylové skupiny na C1 viz Obr. 2, Obr. 3 a Obr. 4. Tyto dva anomery také ve vodném roztoku existují ve vzájemné rovnováze. Ve vodném roztoku glukózy se tedy vyskytují 2 cyklické formy (β-glukopyranóza a α-glukopyranóza), v malé míře pak otevřený řetězec glukózy [24]. Vodný roztok fruktózy převážně obsahuje β-fruktopyranózu, β-fruktofuranózu a α-fruktofuranózu, v menším zastoupení pak α-fruktopyranózu a otevřený řetězec fruktózy [26]. α-anomer a β-anomer mají odlišnou hodnotu optické otáčivosti. Například měrná optická otáčivost α-D-glukopyranózy je +112,2 ° a β-D-glukopyranózy +18,7 °. Vodný roztok obsahující 64 % β-anomeru a 36 % β--anomeru má měrnou optickou otáčivost 56,2 ° [24].

Sacharóza je disacharid složený z molekul α-D-glukopyranózy a β-D-fruktofuranózy viz Obr. 5. Tyto 2 monosacharidy jsou vzájemně spojené glykosidovou vazbou mezi C1 D-glukózy a C2 D-fruktózy. Sacharóza není na rozdíl od glukózy a fruktózy schopná mutarotace, je tedy ve vodném roztoku přítomna pouze v jedné formě [24].



Obr. 5: Strukturní vzorec sacharózy [24]

Aldehydovou skupinu aldóz je možné oxidovat pomocí oxidačního činidla. Produktem takovéto oxidace je karboxylová (aldonová) kyselina. Oxidované mohou být ale i některé ketózy, například D-fruktóza, i přesto, že neobsahují aldehydovou skupinu. Je to způsobeno tím, že ketoforma D-fruktózy se pomocí keto-enol tautomerních přesmyků může přeměnit na aldehyd viz Obr. 6. [24]. Tato reakce je příkladem Lobry de Bruynova – Alberda Van Ekensteinova přesmyku a probíhá v zásaditém, ale i kyselém prostředí [27].



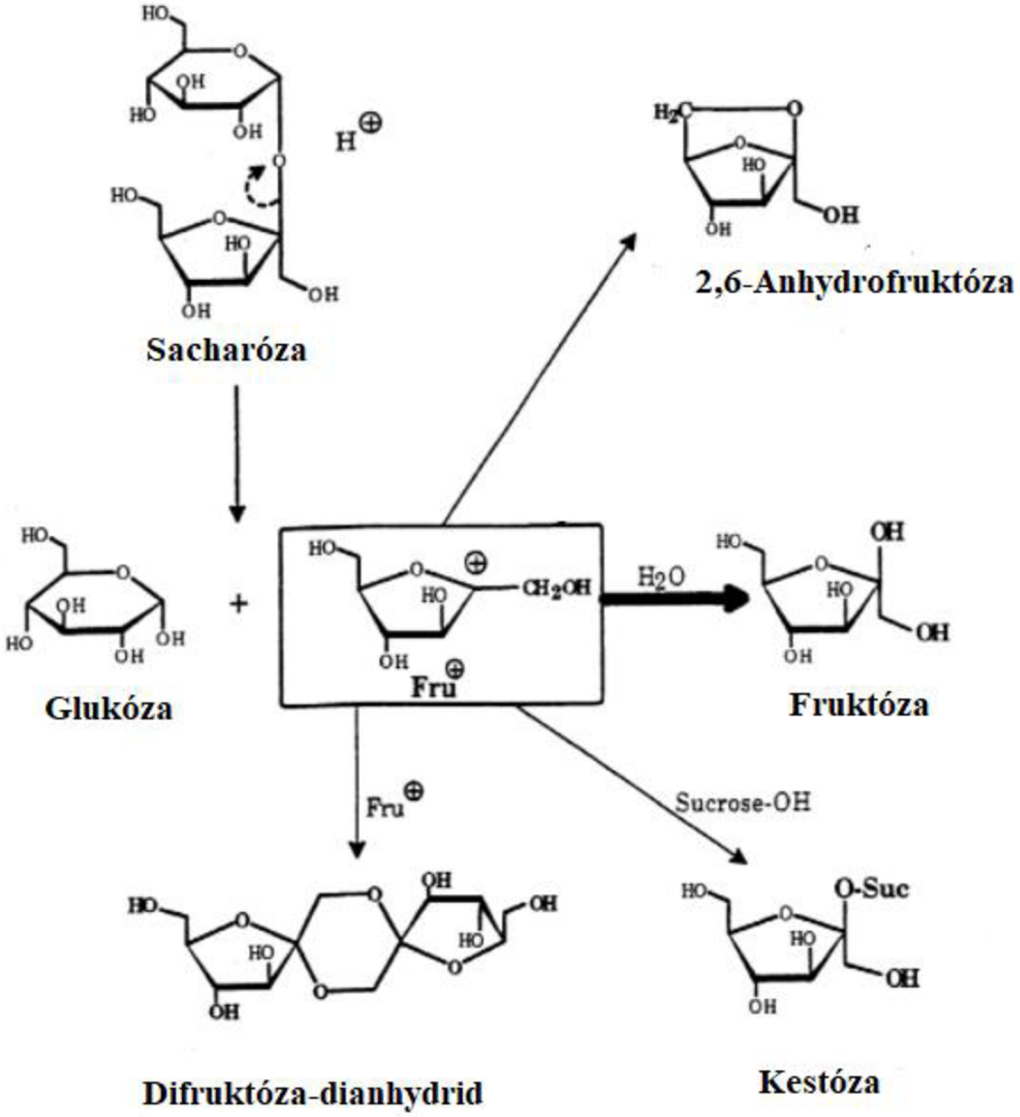
Obr. 6: Přesmyk ketoformy D-fruktózy na aldoformu [24]

Z důvodu schopnosti redukovat oxidační činidla se glukóza a fruktóza řadí mezi tzv. redukující cukry. Sacharóza je naopak cukrem neredukujícím, protože není schopna mutarotace. Této skutečnosti lze využít v analytické chemii ke stanovení invertního cukru (suma fruktózy a glukózy) v invertním sirupu pomocí Tollensova nebo Fehlingova oxidačního činidla [24].

2.2 Kyselá hydrolýza sacharózy

2.2.1 Mechanismus kyselé hydrolýzy sacharózy

V kyselém prostředí (přítomnosti H_3O^+ iontů) dochází ke štěpení molekuly sacharózy na fruktózu a glukózu. Reakce začíná protonací kyslíku v glykosidové vazbě H_3O^+ ionty, následně dochází ke štěpení glykosidové vazby [28]. V roce 1988 *T. L. Mega a R. L. Van Etten* [29] došli k závěru, že ke štěpení glykosidové vazby dochází mezi fruktózou a atomem kyslíku v glykosidové vazbě, nikoliv mezi glukózou a atomem kyslíku viz Obr. 7. To, že štěpení probíhá mezi fruktózou a atomem kyslíku v glykosidové vazbě podpořili v roce 2013 *S. Yamabe a spol.* svými výpočty [30].



Obr. 7: Kyselá hydrolýza sacharózy [28]

Produkty štěpení glykosidové vazby mezi atomem kyslíku a fruktózou jsou α-D-glukopyranóza a D-fruktofuranózový kation, který následně reaguje s H_2O za vzniku β-D-fruktofuranózy viz Obr. 7. Zároveň ale může D-fruktofuranózový kation reagovat s přítomnou sacharózou za vzniku trisacharidu (kestózy), anebo další molekulou fruktózy za vzniku difruktóza--dianhydridu viz Obr. 7. Všechny tyto reakce D-fruktofuranózového kationtu včetně reakce s H_2O vedou k regeneraci H_3O^+ iontu. Čím vyšší je koncentrace cukrů v roztoku, tím větší je šance, že D-fruktofuranózový kation bude reagovat s ostatními sacharidy, nikoliv s H_2O [28].

2.2.2 Kinetika kyselé hydrolýzy sacharózy

Kyselá hydrolýza sacharózy je vyjádřená stechiometrickou rovnicí (4) [31].

$$C_{12}H_{22}O_{11}\left(\text{sacharóza}\right)+H_2O\xrightarrow{H_3O^+}C_6H_{12}O_6\left(\text{fruktóza}\right)+C_6H_{12}O_6\left(\text{glukóza}\right) \qquad (4)$$

Rychlost kyselé hydrolýzy je závislá na koncentraci reaktantů, koncentraci katalyzátoru (H_3O^+) a teplotě. Při konstantní teplotě a pH se jedná o reakci pseudoprvního řádu, kdy je rychlostní konstanta závislá pouze na koncentraci jednoho reaktantu (sacharózy) viz rovnice (5) a rovnice (6) po integraci a úpravě. Je to z důvodu nadbytku molární koncentrace H_2O oproti molární koncentraci sacharózy [31].

$$-\frac{d(c_{S_0}-c_i)}{dt}=k(c_{S_0}-c_i) \qquad (5)$$

$$c_{S_0}-c_i=c_{S_0}\cdot e^{-kt} \qquad (6)$$

Vysvětlivky: c_{S_0} – počáteční molární koncentrace sacharózy [mol·dm^{-3}]; c_i – molární koncentrace invertního cukru v daný čas [mol·dm^{-3}]; t – čas [min]; k – rychlostní konstanta [min^{-1}]

Bylo prokázáno, že i kyselá hydrolýza nasyceného roztoku sacharózy probíhá kinetikou pseudoprvního řádu, i přesto, že by se dalo z důvodu nižší koncentrace H_2O předpokládat, že se bude jednat o reakci druhého řádu [31]. Rychlostní konstanta kyselé hydrolýzy sacharózy je závislá na koncentraci H_3O^+ iontů a teplotě. Čím nižší pH a čím vyšší teplota, tím rychleji hydrolýza probíhá [32].

2.3 Výroba invertních sirupů pomocí kyselé hydrolýzy

Kyselá hydrolýza je jedna z možností, jak invertní sirup průmyslově vyrobit. Dalšími možnostmi jsou použití enzymu či iontoměniče jako katalyzátoru [33]. Výroba invertního sirupu pomocí kyselé hydrolýzy začíná rozpuštěním sacharózy ve vodě a následnou filtrací [34]. Vzniklý cukerný sirup je následně hydrolyzován při vysoké teplotě v kyselém prostředí. Konkrétní výrobní podmínky (teplota a pH) kyselé hydrolýzy sacharózy popsané v patentové literatuře jsou shrnuty v Tab. 6.

Tab. 6: Výrobní podmínky (pH a teplota) pro kyselou hydrolýzu sacharózy popsané v patentové literatuře

Zdroj	Teplota [°C]	pH
[35]	70–95	-
[36]	90–100	1,0–2,0
[37]	85–98	2,0–3,5
[38]	106–109	3,5–4,0
[39]	60–105	1,0–4,0

K výrobě invertních sirupů pomocí kyselé hydrolýzy se nejčastěji používá kyselina chlorovodíková, sírová, fosforečná nebo citrónová [36]. Po dosažení požadované koncentrace invertního cukru je hydrolýza sacharózy zastavena ochlazením a zvýšením pH sirupu pomocí zásady [37].

2.4 Možnosti stanovení koncentrace invertního cukru v invertních sirupech

Obsah invertního cukru je významný kvalitativní parametr invertních sirupů. V souladu s evropskou legislativou je nutné u tekutých invertních sirupů obsah invertního cukru uvádět na etiketě [40]. Pro stanovení obsahu koncentrace invertního cukru v invertních sirupech existuje více analytických metod, některé z nich jsou pro stanovení koncentrace invertního cukru v invertních sirupech vhodnější, některé méně.

2.4.1 Titrační stanovení

Invertní cukr je směs redukujících cukrů (fruktózy a glukózy), naopak sacharóza je cukr neredukující. Titrační stanovení invertního cukru v invertních sirupech je založeno na výše uvedených vlastnostech invertního cukru a sacharózy. Redukující cukry jsou schopny redukovat oxidační činidlo, jehož oxidovaná forma, případně nezreagovaná redukovaná forma, je následně stanovena titrací a obsah redukujících cukrů stechiometricky dopočítán [41]. Mezi standardizované titrační analytické metody pro stanovení redukujících cukrů patří například stanovení dle Lana a Eynona a stanovení dle Luffa Schoorla [42].

Stanovení dle Lana a Eynona využívá jako oxidační činidlo Fehligův roztok, který obsahuje měďnaté ionty. Fehlingův roztok o známé koncentraci je zahřát a následně titrován pomocí roztoku analyzovaného vzorku. Cu^{2+} ionty reagují s redukujícími cukry a tvoří se Cu^{+} ionty ve formě oxidu měďného (Cu_2O). To, že byly zredukované veškeré Cu^{2+} ionty a titrace má být zastavena, je indikováno pomocí methylenové modři. Tento indikátor přejde z původní modré oxidované formy na bezbarvou redukovanou, finální roztok má pak načervenalou barvu díky přítomnosti Cu_2O [41].

Stanovení dle Luffa Schoorla také spočívá v redukci Cu^{2+} iontů na Cu^{+} ionty. V tomto případě se ale nechá Luff-Schorlovo činidlo v nadbytku obsahující Cu^{2+} zreagovat s analyzovaným vzorkem a nezreagované Cu^{2+} ionty se stanoví jodometricky [41].

Eduardo Ramirez Asquieri a spol. ve svém experimentu použili obě tyto metody pro stanovení redukujících cukrů v ovocných nektarech a nápojích a zjistili, že výsledky těchto dvou metod se významně statisticky neliší ($P \leq 0{,}05$, Tukeyho test) [43].Obě tyto metody jsou poměrně časově náročné a je k nim potřeba velké množství chemikálií [42], což není pro kontrolní metodu výrobního procesu žádoucí. Navíc postupy obou těchto metod představují velký prostor pro lidskou chybu [41], což může mít negativní vliv na opakovatelnost a reprodukovatelnost metody.

2.4.2 UV-VIS spektroskopie

Příkladem UV-VIS spektroskopického stanovení invertního cukru je stanovení dle Nelsona a Somogyiho, jehož princip je stejně jako u stanovení dle Lana a Eynona a dle Luffa Schoorla redukce Cu^{2+} iontů na Cu^{+} ionty, které následně ještě reagují s arsenomolybdenovým komplexem. Produktem této reakce je molybdenova modř, jejíž koncentrace se dá stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 600 nm. Stejně jako titrační metody je i spektrofotometrické stanovení dle Nelsona a Somogyihočasově náročné a vyžaduje použití velkého množství chemikálií [44].

2.4.3 Blízká infračervená (NIR) spektroskopie

NIR spektroskopie je metoda, která se v posledních letech začíná více a více využívat pro stanovení kvalitativních parametrů v potravinářských výrobcích [45], včetně těch cukrovarnických [46]. Pomocí NIR spektroskopie lze mimo jiné stanovit koncentraci fruktózy, glukózy a sacharózy ve vzorku [47]. Princip této metody spočívá v měření absorpce záření o vlnové délce 800–2500 nm molekulami látek v analyzovaném vzorku. Její výhodou je rychlost a jednoduchost stanovení bez použití chemikálií a rozpouštědel. Zároveň lze pomocí této metody stanovit současně s koncentrací cukrů i jiné parametry invertních sirupů jako je barva, sušina či popel [46]. Nevýhodou této metody je vyšší pořizovací cena přístroje a obtížná intepretace infračervených spekter, k jejichž kvantitativnímu vyhodnocení je potřeba využít software. Pro každý parametr je nutné provést kalibraci vůči referenční metodě [45].

2.4.4 Enzymatické stanovení

Obsah fruktózy a glukózy, a tedy i invertního cukru, je rovněž možné stanovit enzymaticky. Enzymatické stanovení dle ICUMSA spočívá ve fosforylaci glukózy a fruktózy na glukózu-6--fosfát (G-6-P) a fruktózu-6-fosfát (F-6-P) pomocí hexokinázy v přítomnosti ATP. Následně je použita glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, který katalyzuje oxidaci G-6-P pomocí $NADP^+$, které se redukuje na NADPH. Koncentrace NADPH je poté měřena spektrofotometricky při 340 nm. Fruktóza musí být nejdříve pomocí G-6-P-izomerázy přeměněna na G-6-P, která se následně oxiduje a spektrofotometricky stanovuje již popsaným způsobem. I tato metoda zabere poměrně dost času, a to minimálně 35 minut [48].

2.4.5 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie nabízí možnost stanovit kvantitativně obsah glukózy, fruktózy, sacharózy a případně i jiných sloučenin v rámci jednoho měření, což představuje velkou výhodu oproti ostatním zmíněným metodám. Zároveň se jedná o relativně rychlé stanovení [49].

Metod kapalinové chromatografie vhodných pro stanovení monosacharidů v invertním sirupu existuje více. Jednou z možností je oficiální ICUMSA HPLC metoda pro stanovení cukerného profilu invertních sirupů. Při této metodě se používá jako stacionární fáze katex s navázanými Ca^{2+} ionty na povrchu. Jako mobilní fáze se používá destilovaná voda. Jednotlivé separované složky jsou následně detekovány pomocí refraktometrického detektoru [50].

Další možností je použít harmonizovanou HPLC metodu s refraktometrickou detekcí Mezinárodní komise pro med (IHC) [51]. Med je totiž co se složení týče velmi podobný invertnímu cukru, obsahuje převážně fruktózu a glukózu, v menším množství sacharózu a maltózu [52]. Pro stanovení cukrů dle této HPLC metody se používá silikagel modifikovaný aminovou funkční skupinou jako stacionární fáze a směs acetonitrilu a destilované vody v poměru 4:1 jako mobilní fáze [51]. Tuto metodu vyvinuli *Baumann a Bogdanov*, kteří ji v roce 1988 použili ke stanovení cukerného profilu v medu [53]. *V. Ceksteryte a J. Racys* použili stejnou metodu pro stanovení sacharidů v invertních sirupech určených ke krmení včel [54].

2.4.6 Polarimetrie

Polarimetrie je metoda, při které se měří optická otáčivost vzorku α [°]. V cukrovarnictví je běžnější optickou otáčivost vyjadřovat pomocí polarizace (P), jejíž jednotkou jsou stupně polarizace [°Z]. Stupně polarizace vyjadřují obsah sacharózy ve vzorku, kde 100 °Z odpovídá 100 % sacharózy. Toto stanovení vychází z faktu, že optická otáčivost je lineárně závislá na koncentraci opticky aktivní látky a z předpokladu, že vzorek obsahuje pouze jednu opticky aktivní látku – sacharózu. V takovém případě „normální cukerný roztok“, který je definovaný jako 100 ml vodného roztoku obsahující 26,000 g sacharózy navážené při atmosférickém tlaku a 20 °C, má při průchodu polarizovaného světla o 589 nm vlnové délky v kyvetě o délce 1 dm optickou otáčivost rovnu 34,626 ± 0,001 °.

Ve skutečnosti však žádný výrobek cukrovarnického průmyslu neobsahuje pouze sacharózu, jakožto jedinou opticky aktivní látku, což má negativní vliv na přesnost tohoto stanovení. I přesto je tato metoda díky své jednoduchosti hojně využívaná pro stanovení čistoty (obsahu sacharózy) v sypkém řepném nebo třtinovém cukru. Cukr obsahuje opticky neaktivní nečistoty, případně malé procento opticky aktivních látek včetně fruktózy a glukózy. Toto malé procento jiných opticky aktivních látek výsledky zkresluje minimálně [55].

V případě invertních sirupů už bohužel nelze obsah jiných opticky aktivních látek zanedbat, jelikož obsahují vysoké procento glukózy a fruktózy, které významně ovlivňují optickou otáčivost vzorku viz kapitola 2.1.1. I přesto lze obsah sacharózy, případně invertního cukru, v invertních sirupech polarimetricky stanovit. K tomuto účelu lze využít metodu dvojí polarizace dle Clergeta a Herzfelda. Tato metoda je na rozdíl od klasické polarimetrie vhodná ke stanovení sacharózy ve vzorcích, které kromě sacharózy obsahují jiné opticky aktivní látky.

Při této analytické metodě se změří polarizace vzorku, následně se vzorek okyselí kyselinou chlorovodíkovou a ohřeje na 69 °C. Díky tomu se přítomná sacharóza ve vzorku hydrolyzuje na invertní cukr. Po kompletní hydrolýze sacharózy se vzorek ochladí a znovu se změří polarizace vzorku. Obsah invertního cukru (původní sacharózy) se následně vypočte dle vztahu (7) [56].

$$S = \frac{100 \cdot (P_0 - P)}{132,66 - 0,5(T - 20)} \quad [\%] \tag{7}$$

Vysvětlivky: S – hmotnostní zlomek invertního cukru (původní sacharózy) ve vzorku; P_0 – polarizace před inverzí [°Z]; P – polarizace po inverzi [°Z]; T – teplota [°C]

Při 20 °C, což je standardní teplota stanovení, tedy platí vztah (8).

$$S = \frac{100 \cdot (P_0 - P)}{132,66} \quad [\%] \tag{8}$$

Clergetova-Herzfeldova konstanta 132,66 byla odvozena ze skutečnosti, že u roztoku invertního cukru vzniklého hydrolýzou sacharózy kyselinou chlorovodíkovou při 69 °C byla naměřena polarizace 32,66 °Z (teplota měření 20 °C). Polarizace 100% sacharózy vychází 100 °Z. 132,66 °Z je tedy celková změna polarizace vzorku před a po inverzi v případě invertování 100% sacharózy [57].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité vybavení a chemikálie

3.1.1 Vybavení pro kapalinovou chromatografii

- Kapalinový chromatograf (ECOM řada 2000, rok výroby 2013)
- Stacionární fáze: Kolona (Tessek Separon SGX NH2, 5 μm; 3 × 15 mm)
  Předkolona (Tessek Separon SGX NH2, 5 μm; 3 × 33 mm)
- Refraktometrický detektor (Schambeck RI 2012A)
- Software (Clarity)

3.1.2 Ostatní vybavení

- Refraktometr (ATR BR, Schmidt-Haensch, zdroj záření $\lambda = 589{,}3$ nm)
- Polarimetr (Polatronic MHZ, Schmidt-Haensch, zdroj záření $\lambda = 589{,}3$ nm, délka kyvety L = 2 dm)
- Analytické digitální váhy (SBC31, Scaltec)
- Váhy (EXCELL S1-132, Provinter)
- Termostat (IN110m, Memmert)
- pH metr (MI 180 Bench Meter, Milwaukee)
- Třepačka (KS125basic, IKALABORTECHNIK)
- Automatické pipeta (Transferpette, 100–1000 μl, BRAND)
- Automatická pipeta (Discovery comfort 8-Channel Pipette, 50–300 μl, HTL)
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek)
- Elektrický vařič
- Lihový teploměr
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.1.3 Chemikálie

- Cukr bílý krystal (Tereos TTD)
- Sacharóza (≥ 99 %, MERCK)
- D-fruktóza (≥ 99 %, Sigma-Aldrich)
- D-glukóza (≥ 99,5 %, Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková (EMSURE®, Merck)
- Acetonitril ((≥ 99,9 %, Carlo Erba Reagents)
- Demineralizovaná (demi) voda
- Pitná voda

3.2 Použité analytické metody

3.2.1 Stanovení refraktometrické sušiny

Refraktometrická sušina [°Bx] byla stanovena dle metody ICUMSA GS4/3/8–13 [23]. Index lomu byl změřen při 20 °C pomocí refraktometru, který automaticky přepočítává stanovený index lomu na refraktometrickou sušinu dle ICUMSA. Hodnota refraktometrické sušiny [°Bx] byla odečtena s přesností 0,1 g.

3.2.2 Stanovení polarizace

Polarizace byla stanovena dle metody ICUMSA GS2/3–1 [58]. Pro stanovení bylo naváženo 26,000 0 g vzorku do odměrné baňky. Následně bylo přidáno zhruba 60 ml demi vody a vzorek byl s vodou promíchán na třepačce po dobu 10 minut. Objem byl doplněn těsně pod rysku a roztok byl temperován při laboratorní teplotě (20 ± 1 °C) po dobu minimálně 4 hodin. Poté byl objem doplněn po rysku a byla změřena optická otáčivost roztoku pomocí polarimetru, který stanovenou optickou otáčivost automaticky přepočítává na hodnotu polarizace [°Z] dle ICUMSA. Polarizace [°Z] byla odečtena s přesností 0,01 °Z.

3.2.3 Stanovení pH

Stanovení pH bylo provedeno dle metody ICUMSA GS1/2/3/4/7/8/9–23 [59]. Bylo odváženo 30,0 g vzorku a smícháno s 30,0 g demi vody. Následně bylo změřeno pH roztoku pomocí pH metru při 20 °C.

3.2.4 Kapalinová chromatografie – stanovení stupně inverze

Použitá instrumentace pro kapalinovou chromatografii je vyjmenovaná v kapitole 3.1.1. Mobilní fáze byla připravena smícháním acetonitrilu a demi vody v poměru 80:20 (acetoniril : voda) a odvzdušněním v ultrazvukové lázni. Průtok byl nastaven na 1,30 $ml \cdot min^{-1}$ izokraticky. Objem nástřiku byl 5 µl. Tato metoda vychází z IHC harmonizované metody pro med [51]. Oproti harmonizované metodě jsou kolona a refraktometrický detektor temperovány na 35 °C, nikoliv na 30 °C. Ostatní parametry jsou zachovány.

Vzorek byl pro stanovení kapalinovou chromatografií naředěn na koncentraci 10–50 $mg \cdot ml^{-1}$ navážením 1,000–5,000 g do odměrné baňky (100 ml). Objem byl doplněn demi vodou. Získané výsledky koncentrací jednotlivých cukrů (fruktóza, glukóza, sacharóza) jsou udávané v g/100 g cukrů celkem (fruktóza + glukóza + sacharóza). U invertních sirupů se dá předpokládat, že suma koncentrace fruktózy, glukózy a sacharózy se rovná sušině, potom se dá výsledek g/100 g celkových cukrů vyjádřit jako % hmot. v sušině (stupeň inverze) viz vztah (9).

$$I = \frac{c_m(FRU) + c_m(GLU)}{c_m(FRU) + c_m(GLU) + c_m(SUC)} \cdot 100 \quad [\%] \qquad (9)$$

Vysvětlivky: I – stupeň inverze; c_m – hmotnostní koncentrace [$mg \cdot ml^{-1}$]; FRU – fruktóza, GLU – glukóza, SUC – sacharóza

3.3 Použité statistické vyhodnocení

3.3.1 Výběrová směrodatná odchylka

Výběrová směrodatná odchylka (s) průměru vícero stanovených hodnot byla vypočtena dle vztahu (10) [60]. Průměrné hodnoty změřené v rámci této práce jsou udávané ve tvaru průměr ± výběrová směrodatná odchylka.

$$s = \sqrt{\frac{\sum\left(x-\bar{x}\right)^2}{\left(N-1\right)}} \qquad (10)$$

Vysvětlivky: s – směrodatná výběrová odchylka; x – naměřená hodnota; $\bar{x}$ - průměrná hodnota všech měření; N – počet měření

3.3.2 Přesnost metody

Přesnost metody byla posuzována dle normy ČSN ISO 5725, dle které pojem přesnost metody zahrnuje pojmy správnost a preciznost [61].

Správnost metody popisuje těsnost shody výsledků dané metody s přijatou referenční hodnotou měřeného parametru, jednodušeji řečeno správnost metody nám říká, do jaké míry získané výsledky odpovídají přijatým (odhadovaným) skutečným hodnotám. Míra správnosti se obvykle vyjadřuje pomocí vychýlení (Bias) [61]. V této práci je konkrétně používáno relativní vychýlení viz vztah (11) [62].

$$B = \frac{\bar{x}-\mu}{\mu} \cdot 100 \quad [\%] \qquad (11)$$

Vysvětlivky: B – relativní vychýlení (Bias); $\bar{x}$ – průměrná hodnota všech měření; μ – referenční hodnota

Preciznost metody je definovaná jako těsnost shody mezi nezávislými výsledky měření čili do jaké míry se výsledky jednotlivých měření liší. Pokud posuzujeme preciznost metody pomocí měření provedených v téže laboratoři, tímtéž operátorem, za použití téhož vybavení během krátkého časového rozmezí mluvíme o tzv. opakovatelnosti metody. Pokud posuzujeme preciznost pomocí měření provedených v různých laboratořích, různými operátory a provedených na různých zařízení mluvíme o tzv. reprodukovatelnosti metody. Preciznost (opakovatelnost i reprodukovatelnost) se obvykle počítá jako směrodatná odchylka výsledků jednotlivých zkoušek [61]. V této práci byla směrodatná odchylka vypočtena dle vztahu (10).

3.3.3 Bland-Altmanův graf

Pro statistické srovnání výsledků stupně inverze stanovených pomocí refraktometrie a polarimetrie s výsledky stupně inverze stanovených pomocí HPLC/RI jakožto referenční metody bylo použité grafické znázornění dle Blanda a Altmana [63]. Pro tento účel byl sledovaný parametr (stupeň inverze) stanoven pomocí srovnávané metody (v našem případě

stanovení pomocí polarimetrie a refraktometrie) a referenční metody (v našem případě HPLC/RI). Následně byl vypočten průměr hodnot získaných oběma metodami dle vztahu (12) a rozdíl stanovených hodnot pomocí referenční metody a srovnávané metody dle vztahu (13).

$$\bar{I} = \frac{1}{2} \times (I_{HPLC/RI} + I_{REFPOL}) \quad [\%] \tag{12}$$

Vysvětlivky: $\bar{I}$ – průměrná hodnota stanovení stupně inverze pomocí referenční a srovnávané metody, $I_{HPLC/RI}$ – stupeň inverze stanovený pomocí HPLC/RI [%]; I_{REFPOL} – stupeň inverze stanovený pomocí refraktometrie a polarimetrie [%]

$$d = (I_{HPLC/RI} - I_{REFPOL}) \quad [\%] \tag{13}$$

Vysvětlivky: d – rozdíl stanovených hodnot pomocí referenční a srovnávané metody, $I_{HPLC/RI}$ – stupeň inverze stanovený pomocí HPLC/RI [%]; I_{REFPOL} – stupeň inverze stanovený pomocí refraktometrie a polarimetrie [%]

Získaný průměr hodnot obou stanovení byl vynesen do Bland-Altmanova grafu na osu x a rozdíl hodnot obou stanovení byl vynesen na osu y. Bland-Altmanův graf navíc obsahuje vyobrazené horní a spodní limity shody a průměrnou hodnotu rozdílů srovnávaného a referenčního stanovení. Průměrný rozdíl těchto dvou stanovení byl stanoven dle vztahu (14). Spodní a horní limity shody jsou definovány jako průměrný rozdíl srovnávaných stanovení ± 95% interval spolehlivosti, který definuje rozmezí od stanoveného průměru, ve kterém se s 95% pravděpodobností bude vyskytovat hodnota rozdílu za předpokladu, že jsou stanovené rozdíly jednotlivých měření pomocí obou metod normálně rozděleny (Gaussovo rozdělení). Spodní a horní limit byl stanoven dle vztahu (15), resp. dle vztahu (16).

$$\bar{d} = \frac{1}{N} \cdot \sum d_i \quad [\%] \tag{14}$$

Vysvětlivky: $\bar{d}$ – průměrná hodnota rozdílu stanoveného dle vztahu (13); N – počet srovnávacích měření; d_i – rozdíl stanovený dle vztahu (13) pro konkrétní měření [%]

$$d_{LOW} = \bar{d} - 1{,}96 \cdot s \quad [\%] \tag{15}$$

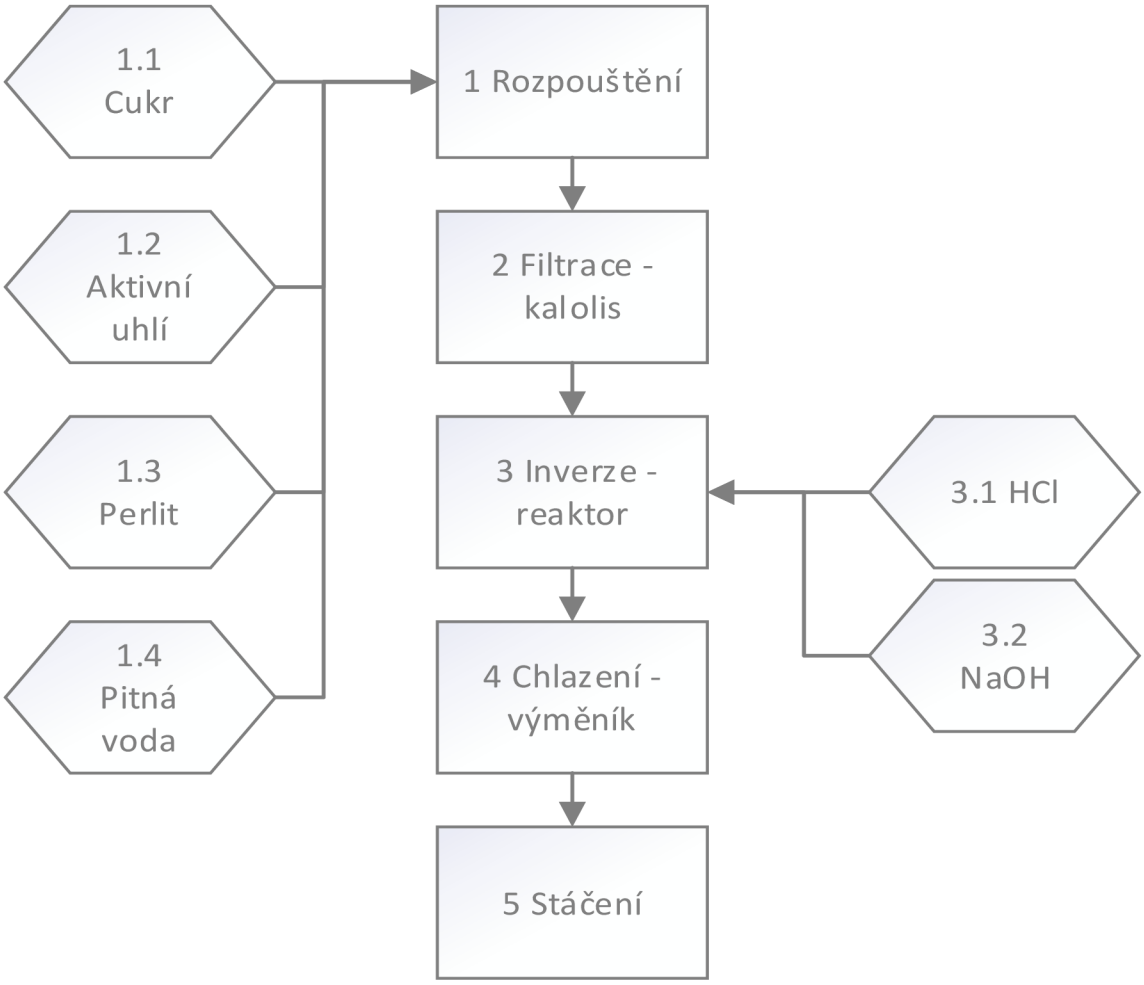
Vysvětlivky: d_{LOW} – spodní limit shody; $\bar{d}$ – průměrná hodnota rozdílu stanoveného dle vztahu (13) [%]; s – výběrová směrodatná odchylka hodnoty $\bar{d}$ stanovená dle vztahu (10) [%]

$$d_{UP} = \bar{d} + 1{,}96 \cdot s \ [\%] \qquad (16)$$

Vysvětlivky: d_{UP} – horní limit shody; $\bar{d}$ – průměrná hodnota rozdílu stanoveného dle vztahu (13) [%]; s – výběrová směrodatná odchylka hodnoty $\bar{d}$ stanovená dle vztahu (10) [%]

3.4 Popis výroby invertních cukrů ve firmě EDFMI

EDFMI vyrábí invertní sirupy o stupni inverze v rozmezí 50–100 % a o sušině 72–78 %. pomocí kyselé hydrolýzy, převážně pomocí kyseliny chlorovodíkové, z řepného cukru. Proces výroby začíná rozpuštěním cukru (zahřátí na 85 °C), následuje filtrace. Inverze probíhá v reaktoru o objemu 11 m^3. Inverze probíhá při pH 2,4 (přidání kyseliny chlorovodíkové) a teplotě 80 °C. Po dosažení požadovaného stupně inverze, je inverze ukončena zvýšením pH na 4,0–7,0 (přídavek hydroxidu sodného) a ochlazením na 30 °C. Zjednodušené schéma výroby je vyobrazeno na Obr. 8.



Obr. 8 - Schéma výroby invertních sirupů pomocí kyselé hydrolýzy v EDFMI

3.5 Popis experimentu

3.5.1 Statistické vyhodnocení přesnosti metody HPLC/RI

Jelikož bude metoda kapalinové chromatografie viz kapitola 3.2.3 používaná k ověření přesnosti výsledků jiné metody, je dobré ověřit přesnost (správnost a preciznost) dané metody HPLC/RI. Přesnost byla ověřena pomocí 3 standardních roztoků o různých hmotnostních koncentracích fruktózy (FRU), glukózy (GLU) a sacharózy (SUC). Pro přípravu standardů byla použita D-fruktóza o čistotě ≥ 99 %, D-glukóza o čistotě ≥ 99,5 %, sacharóza o čistotě ≥ 99 %. Standardní roztoky byly připraveny navážením jednotlivých cukrů do odměrné baňky o objemu 100 ml s přesností 0,001 g, následně byla přidána demi voda zhruba do poloviny objemu a roztok byl ponechán 10 minut na třepačce, aby se obsah řádně promíchal.Po rozpuštění cukrů byl doplněn objem po rysku. Navážené hmotnostní kocentrace (c_m) jednotlivých cukrů v standardních roztocích jsou shrnuty v Tab. 7.

Tab. 7: Navážené hmotnostní koncentrace fruktózy, glukózy a sacharózy v standardních roztocích

	Standard 1	Standard 2	Standard 3
c_m (FRU) [mg·ml^{-1}]	20,00	10,06	5,03
c_m (GLU) [mg·ml^{-1}]	20,00	10,03	5,03
c_m (SUC) [mg·ml^{-1}]	20,00	10,00	5,01

Vysvětlivky: c_m – hmotnostní koncentrace; FRU – fruktóza, GLU – glukóza, SUC – sacharóza

Navážené hmotnostní koncentrace byly přijaty jako referenční hodnoty pro stanovení správnosti HPLC/RI. Správnost byla vyjádřena jakožto relativní vychýlení (Bias) vypočteného dle vztahu (11).

Preciznost metody HPLC/RI byla stanovena pouze pomocí opakovatelnosti, nikoliv reprodukovatelnosti. Opakovatelnost byla vyjádřena pomocí výběrové směrodatné odchylky viz vztah (10) z hodnot 3 měření jednoho vzorku za stejných podmínek (laborant, přístroje, podmínky měření).

3.5.2 Stanovení invertního cukru v invertních sirupech pomocí modifikace metody dvojité polarizace a srovnání výsledků s HPLC/RI metodou

Pro rychlé a jednoduché stanovení invertního cukru v invertních sirupech EDFMI používá stanovení pomocí polarimetrie v kombinaci s refraktometrií. Toto stanovení vychází z předpokladu, že refraktometrická sušina [°Bx] vyráběného invertního sirupu se blíží reálné sušině, tím pádem také hodnotě polarizace sacharózy před inverzí. Potom lze z hodnot refraktometrické sušiny a polarizace invertního sirupu vypočítat hmotnostní zlomek invertního cukru v invertním sirupu [%] dle vztahu (17).

$$S = \frac{100 \cdot (Bx - P)}{132,66} \quad [\%] \tag{17}$$

Vysvětlivky: S – hmotnostní zlomek invertního cukru (zinvertované sacharózy) v invertním sirupu; Bx – refraktometrická sušina [°Bx]; P – polarizace [°Z]

Tento vztah vychází z Clerget-Herzfeldovy rovnice viz vztah (8). Polarizace před inverzí (P_0) z původní rovnice (8) je nahrazena refraktometrickou sušinou (Bx). Pro výpočet stupně inverze je potřeba vypočtenou hodnotu vztáhnout na sušinu. Za předpokladu, že se hodnota refraktometrické sušiny blíží reálné sušině, lze rovnici (17) upravit na rovnici (18).

$$I = \frac{100^2}{132,66} \cdot \frac{Bx - P}{Bx} \quad [\%] \tag{18}$$

Vysvětlivky: I – stupeň inverze; Bx – refraktometrická sušina [°Bx]; P – polarizace [°Z]

Tato modifikace metody dvojité polarizace je rychlejší než původní metoda, jelikož není potřeba měřit polarizaci před a po inverzi.

Výsledky stanoveného stupně inverze dle vztahu (18) byly porovnána s HPLC/RI stanovením popsaným v kapitole 3.2.4. Pro tento účel se vybralo 17 náhodných vzorků invertních sirupů vyrobených na výrobní lince ve společnosti EDFMI v období listopad 2020 až květen 2021.

U všech vzorků byla změřena polarizace dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2 a refraktometrická sušina dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1. Z hodnot polarizace a refraktometrické sušiny byl vypočten stupeň inverze dle vztahu (18). Zároveň byl u všech vzorků stanoven stupeň inverze pomocí kapalinové chromatografie popsané v kapitole 3.2.4.

Výsledky stupně inverze pomocí těchto dvou metod byly statisticky srovnány pomocí Bland-Altmanova grafického vyobrazení viz kapitola 3.3.3. Zároveň bylo Shapiro-Wilkovým testem ověřeno, zdali jsou získané hodnoty rozdílu jednotlivých srovnávacích měření vypočtené dle vztahu (13) normálně rozděleny (dle Gaussovského rozdělení) pomocí softwaru STATISTICA 13.

3.5.3 Stanovení koncentrace cukrů v roztoku připraveného dle Clergeta a Herzfelda

Postup přípravy roztoku dle Clergeta a Herzfelda vychází z metody dvojité polarizace [56]. Bylo naváženo 13,000 g sacharózy o deklarované čistotě ≥ 99 % do odměrné baňky o objemu 100 ml. Poté bylo přidáno zhruba 75 ml demi vody. Takto připravená směs se nechala 10 minut míchat na třepačce, dokud nebyla sacharóza zcela rozpuštěna. Po rozpuštění sacharózy bylo do roztoku napipetováno 8,075 ml 25% HCl. V původní metodě je použito 5 ml 38% HCl, bylo proto nutné přepočítat objem pro 25% HCl dle vztahu (19).

$$V_2 = \frac{\rho_1 \cdot V_1 \cdot w_1}{w_2 \cdot \rho_2} \quad [\mathrm{ml}] \tag{19}$$

Vysvětlivky: V_1 – objem 38% HCl [ml]; V_2 – objem 25% HCl [ml]; ρ_1 – hustota 38% HCl při 20 °C [g·ml^{-1}]; ρ_2 – hustota 25% HCl při 20 °C [g·ml^{-1}]; w_1 – hmotnostní procento 38% HCl [%]; w_2 – hmotnostní procento 25% HCl [%]

Dosazené hodnoty: V_1 = 5 ml; ρ_1 = 1,19 g·ml^{-1} [64]; ρ_2 = 1,12 g·ml^{-1} [64]; w_1 = 38 %; w_2 = 25 %

Vztah (19) byl odvozen ze vztahu (20) pro zřeďování roztoků vodou.

$$m_1 \cdot w_1 = m_2 \cdot w_2 \tag{20}$$

Vysvětlivky: w_1 – hmotnostní procento 38% HCl [%]; w_2 – hmotnostní procento 25% HCl [%]; m_1 – hmotnost 38% HCl [g]; m_2 – hmotnost 25% HCl [g]

Po přídavku kyseliny chlorovodíkové byl roztok zahřát ve vodní lázni na 69 °C, po dosažení této teploty byl roztok umístěn do termostatu přednastaveného na 69 °C a ponechán tam po dobu 5 minut. V originální metodě se používá termostatická vodní lázeň roztok je po dosažení 69 °C ponechán v této lázni. V našem experimentu byl použit termostat, jelikož termostatická vodní lázeň nebyla k dispozici. Po uplynutí 5 minut byl roztok ochlazen studenou vodou na laboratorní teplotu 20 °C, čímž byl zastavena inverze. Nakonec byl doplněn objem baňky po rysku.

Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 11,5 ml do druhé odměrné baňky o objemu 100 ml, objem byl doplněn po rysku demi vodou. Tento zředěný roztok byl použit pro stanovení hmotnostní koncentrace fruktózy, glukózy a sacharózy pomocí kapalinové chromatografie viz kapitola 3.2.4.

3.5.4 Stanovení koncentrace cukrů v invertním sirupu připraveného za výrobních podmínek

Pro tento účel bylo v laboratoři připraveno 21 invertních sirupů o různém stupni inverze v rámci 3 simulovaných procesů hydrolýzy sacharózy za výrobních podmínek (koncentrace sacharózy 75 %, pH 2,4 a teplota 80 °C) dle následujícího postupu.

Byly připraveny 3 roztoky sacharózy o sušině 75 % navážením 450,0 g cukru a 150,0 g pitné vody. Byla zvážená brutto hmotnost (cukr, voda, míchadlo, teploměr a kádinka). Tato směs byla zahřívána na elektrickém vařiči 25 minut, dokud nebyla sacharóza rozpuštěna. Poté byla doplněna voda, která se během přípravy sirupu odpařila – brutto váha nebyla doplněna zcela, 0,2 g se ponechalo, jelikož následně byla přidávána ještě kyselina. Sirup byl ochlazen na 80 °C. Následně bylo upraveno pH sirupu na 2,4, brutto váha byla doplněna pitnou vodou s přesností na 0,1 g a kádinka se sirupem byla umístěna do termostatu přednastaveného na 83 °C (přikrytá

alobalem, aby se co nejvíce zabránilo vypařování vody – simulace uzavřeného reaktoru). V termostatu byl sirup ponechán po dobu 65 minut. Během této doby bylo v pravidelných intervalech odebráno 7 vzorků, u kterých se ukončila inverze ochlazením v lázni se studenou kohoutkovou vodou na laboratorní teplotu 20 °C. Vždy byla zaznamenaná brutto hmotnost po odebrání a před každým odběrem byla brutto hmotnost předešlého odběru doplněna pitnou vodou, aby byla udržována konstantní sušina během výroby (simulace uzavřeného reaktoru). Tímto způsobem bylo připraveno 21 vzorků sirupů o různém stupni inverze. Čas [min] ukončení inverze u jednotlivých vzorků byl odečten po vložení vzorku do studené lázně.

U 18 v laboratoři připravených invertních sirupů za výrobních podmínek (první odběry u každé přípravy nebyly zahrnuty z důvodu nízkého obsahu invertního cukru vedoucího ke krystalizaci vzorku) byla stanovena hmotnostní koncentrace fruktózy, glukózy, sacharózy a poměr c_m(FRU):c_m(GLU) pomocí kapalinové chromatografie viz kapitola 3.2.4. Pro tento účel bylo odebráno 1,800–3,750 g sirupu do odměrné baňky o objemu 100 ml, objem byl doplněn po rysku demi vodou.

3.5.5 Optimalizace stanovení invertního cukru v invertních sirupech pomocí polarizace a refraktometrie

Pro účely navržení nového vztahu popisujícího závislost stupně inverze na polarizaci a refraktometrické sušině a zlepšení přesnosti výsledků stanovení stupně inverze v invertních sirupech pomocí polarimetrie a refraktometrie bylo v laboratoři připraveno 72 invertních sirupů o 3 různých koncentracích celkových cukrů (70, 75 a 78 %) a 8 různých stupních inverze (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 %). Invertní sirup o stejné koncentraci celkových cukrů a stejném stupni inverze byl vždy připraven 3x. Poměr c_m(FRU):c_m(GLU) byl u všech připravených sirupů 0,96.

Sirupy byly připraveny navážením fruktózy (čistota ≥ 99 %), glukózy (čistota ≥ 99,5 %), sacharózy (čistota ≥ 99 %) a demi vody s přesností 0,000 1 g. Po navážení byla zvážená brutto hmotnost (kádinka, míchadlo, cukry, voda) a směs byla zahřívána na elektrickém vařiči po dobu 15 minut za účelem rozpuštění cukrů v rozpouštědle (vodě). Po zahřívání byly sirupy ochlazeny na laboratorní teplotu a ponechány přes noc stát.

Následně byla u všech sirupů změřena polarizace dle postupu popsaného v kapitole 3.2.2 a refraktometrická sušina dle postupu popsaného v kapitole 3.2.1. Získané hodnoty polarizace a refraktometrické sušiny jsou vždy průměrnou hodnotou 3 hodnot, jelikož byly připraveny vždy 3 vzorky invertního sirupu o stejné koncentraci celkových cukrů a stupni inverze. U každého vzorku byla refraktometrická sušina a polarizace změřena 1x.

3.5.6 Srovnání výsledků stanovení dle nově navrženého vztahu a HPLC/RI

Pro účel ověření refraktometricko-polarimetrického stanovení dle nově navrženého vztahu bylo použito srovnání s HPLC/RI stanovením popsaným v kapitole 3.2.4. Pro tento účel bylo vybráno 17 náhodných vzorků invertních sirupů vyrobených na výrobní lince ve společnosti

EDFMI v období listopad 2020 až květen 2021. Jednalo se o stejné vzorky, které se použily ke srovnání modifikace metody dvojité polarizace a HPLC/RI viz kapitola 3.5.2.

U všech vzorků byla změřena polarizace dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2 a refraktometrická sušina dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1. Z hodnot polarizace a refraktometrické sušiny byl vypočten stupeň inverze dle nově navrženého vztahu. Zároveň byl u všech vzorků stanoven stupeň inverze pomocí kapalinové chromatografie popsané v kapitole 3.2.4.

Výsledky stupně inverze pomocí refraktometricko-polarimetrického stanovení dle nově navrženého vztahu a pomocí HPLC/RI stanovení byly statisticky srovnány pomocí Bland--Altmanova grafického vyobrazení viz kapitola 3.3.3. Zároveň bylo Shapiro-Wilkovým testem ověřeno, zdali jsou získané hodnoty rozdílu jednotlivých srovnávacích měření vypočtené dle rovnice (13) normálně rozděleny (dle Gaussovského rozdělení) pomocí softwaru STATISTICA 13.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Statistické vyhodnocení přesnosti metody HPLC/RI

Přesnost použité HPLC/RI analytické metody byla stanovena pro 3 různé koncentrace fruktózy, glukózy a sacharózy (20, 10 a 5 mg·ml^{-1}). Stanovené relativní vychýlení oproti referenční hodnotě (Bias) a výběrová směrodatná odchylka 3 měření provedených za stejných podmínek pro všechny tyto koncentrace jsou uvedeny v Tab. 8, Tab. 9 a Tab. 10

Tab. 8: Přesnost HPLC/RI metody pro hmotnostní koncentraci jednotlivých cukrů 20 mg·m^{-1}

	c_m ref [mg·ml^{-1}]	c_m lab [mg·ml^{-1}]	*B* [%]
FRU	20,0	20,7 ± 0,1	3,6
GLU	20,0	19,7 ± 0,1	−1,7
SUC	20,0	20,2 ± 0,1	1,0
FRU + GLU	40,0	40,4 ± 0,1	1,0
	***I* ref [%]**	***I* lab [%]**	***B* [%]**
	66,7	66,7± 0,1	0,0

Tab. 9: Přesnost HPLC/RI metody pro hmotnostní koncentraci jednotlivých cukrů 10 mg·ml^{-1}

	c_m ref [mg·ml^{-1}]	c_m lab [mg·ml^{-1}]	*B* [%]
FRU	10,1	10,4 ± 0,1	2,9
GLU	10,0	9,8 ± 0,1	−2,4
SUC	10,0	10,1 ± 0,0	0,7
FRU + GLU	20,1	20,1 ± 0,1	0,2
	***I* ref [%]**	***I* lab [%]**	***B* [%]**
	66,7	66,6± 0,0	-0,2

Tab. 10: Přesnost HPLC/RI metody pro hmotnostní koncentraci jednotlivých cukrů 5 mg·ml^{-1}

	c_m ref [mg·ml^{-1}]	c_m lab [mg·ml^{-1}]	*B* [%]
FRU	5,0	5,1 ± 0,1	1,6
GLU	5,0	5,0 ± 0,1	−1,4
SUC	5,0	5,0 ± 0,0	−0,6
FRU + GLU	10,0	10,1 ± 0,0	0,1
	***I* ref [%]**	***I* lab [%]**	***B* [%]**
	66,8	66,9± 0,0	0,2

Vysvětlivky: c_m ref – referenční (navážená) hmotnostní koncentrace; c_m lab – průměrná stanovená hmotnostní kocentrace 3 stanovení pomocí HPLC/RI; *B* – relativní vychýlení (Bias) stanovené hodnoty od referenční hodnoty vypočtené dle vztahu (11); *I* ref – referenční (navážená) hodnota stupně inverze; *I* lab –průměrná hodnota 3 stanovení stupně inverze pomocí HPLC/RI dle vztahu (9)

Na základě vypočtených výběrových směrodatných odchylek (s = 0,0–0,1) bylo vyvozeno, že opakovatelnost stanovení hmotnostní kocentrace fruktózy, glukózy, sacharózy a stupně inverze (*I*) je dostatečná na to, aby v následujícím experimentu byl každý vzorek přeměřen pomocí HPLC/RI pouze jednou.

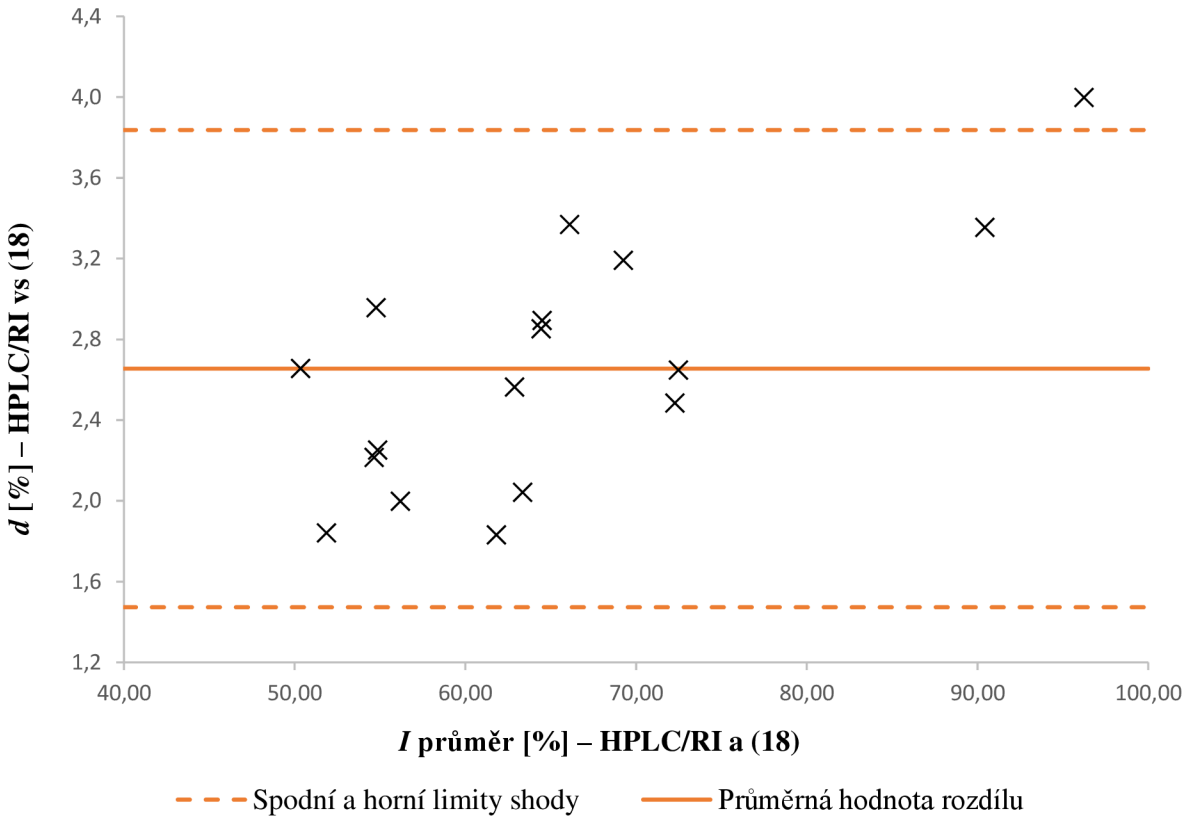
Z vypočteného relativního vychýlení (*B*) stanovené hodnoty, c_m lab, oproti referenční hodnotě, c_m ref (navážená koncentrace cukrů o analytické čistotě), lze vidět, že pro koncentraci 5,0 mg·ml^{-1} byla metoda nejsprávnější, co se stanovení hmotnostní koncentrace jednotlivých cukrů týče. Se zvyšující se koncentrací cukrů se vychýlení stanovené hmotnostní koncentrace všeobecně zvětšuje. Zároveň lze vidět, že stanovená hmotnostní koncentrace sacharózy má menší vychýlení oproti referenční hodnotě, než stanovená hmotnostní koncentrace fruktózy a glukózy. To je způsobeno tím, že retenční časy pro fruktózu a glukózu jsou velmi blízko (2,8 a 3,3 min), což má za následek nižší rozlišení těchto dvou píků.

Vypočtená vychýlení poukazují také na to, že stanovená hmotnostní koncentrace fruktózy pomocí HPLC/RI je vyšší než přijatá referenční koncentrace, a naopak stanovená hmotnostní koncentrace glukózy pomocí HPLC/RI je nižší než přijatá referenční koncentrace.

I přesto, že vychýlení stanovených hmotnostních koncentrací jednotlivých cukrů (především glukózy a fruktózy) oproti referenční metodě je vyšší, vychýlení stanoveného stupně inverze (*I* lab) oproti referenční hodnotě stupně inverze (*I* ref) nabývalo hodnot −0,2–0,2 %, z čehož jde usoudit, že HPLC/RI je přesná metoda co se správnosti stanovení stupně inverze týče. Na základě uspokojivé správnosti a opakovatelnosti stanovení stupně inverze byla metoda HPLC/RI vyhodnocena jako vhodná referenční metoda pro posouzení přenosti výsledků jiné metody stanovení stupně inverze.

4.2 Stanovení invertního cukru v invertních sirupech pomocí modifikace dvojité polarizace a srovnání výsledků s HPLC/RI metodou

Srovnání výsledků stupně inverze stanovených pomocí modifikace Clerget-Herzfeldovy metody (refraktometricko-polarimetrické stanovení stupně inverze používané v EDFMI) a HPLC/RI jsou graficky vyobrazeny v Bland-Altmanově grafu viz Obr. 9.



Obr. 9: Bland-Altmanův graf pro srovnání výsledků stanovení stupně inverze pomocí HPLC/RI a refraktometricko-polarimetrického stanovení dle vztahu (18)

Vysvětlivky: d – rozdíl výsledků HPLC/RI stanovení a stanovení dle vztahu (18); *I* průměr – průměrná hodnota výsledků HPLC/RI stanovení a stanovení dle vztahu (18) ; Průměrná hodnota rozdílu, $\bar{d}$, vypočtena dle vztahu (14); Spodní a horní limity shody (d_{LOW},, d_{UP}) vypočteny dle vztahů (15) a (16)

Ze získaných hodnot stupně inverze pomocí HPLC/RI a pomocí refraktometricko--polarimetrického stanovení dle vztahu (18), kterou EDFMI používá, lze vidět, že hodnoty stupně inverze získané pomocí vztahu (18) jsou nižší než hodnoty získané pomocí HPLC/RI. Průměrný rozdíl výsledků těchto dvou metod byl stanoven na základě analýzy 17 vzorků na 2,7 ± 0,6 %. 95% interval spolehlivosti byl stanoven na ± 1,2 %, což znamená, že za předpokladu normálního rozdělení dat 95 % hodnot rozdílu výsledků stupně inverze pomocí stanovení HPLC/RI a tohoto refraktometricko-polarimetrického stanovení by se mělo nacházet v rozmezí ± 1,2 % od průměrné hodnoty, tedy v rozmezí 1,5–3,8 % (spodní – horní limit shody). Lze předpokládat, že výsledky populace hodnot rozdílů budou mít Gaussovské rozdělení, jelikož hodnoty rozdílů získané na základě změření 17 vzorků byly dle Shapiro-

-Wilkova testu normálně rozděleny (p = 0,631). Průměrný rozdíl 2,7 % byl vyhodnocen jako příliš velký na to, aby analýza pomocí HPLC/RI mohla být uspokojivě nahrazena modifikovaným stanovením dvojité polarizace, a bylo potvrzeno, že je žádoucí, aby byl navržen nový vztah s větší přesností.

Rozdíl výsledků HPLC/RI a modifikace Clerget-Herzfeldovy metody viz vztah (18) je způsoben vícero faktory.

1) Na základě zkušeností EDFMI je známo, že při výrobních podmínkách invertních sirupů (80 °C, pH 2,4 a 70-78 % sušina) vzniká více glukózy než fruktózy. Invertní cukr ve finálních výrobcích tedy není ekvimolární směs fruktózy a glukózy. Hypotéza je taková, že při hydrolýze sacharózy za podmínek dle Clergeta a Herzfelda (69 °C, 5 ml 38% HCl/100 ml roztoku a koncentrace sacharózy 0,13 $g \cdot ml^{-1}$) vzniká invertní cukr s vyšším poměrem c(FRU):c(GLU) než za výrobních podmínek. Z tohoto důvodu je použití Clerget-Herzfeldovy konstanty 132,66 pro výrobní podmínky nepřesné, jelikož vyšší množství glukózy vznikající za výrobních podmínek bude zvyšovat hodnotu optické otáčivosti, tím pádem polarizace.
2) Refraktometrická sušina invertních sirupů je nižší než skutečná sušina viz kapitola 2.1.1. Čím vyšší stupeň inverze, tím větší rozdíl refraktometrické a reálné sušiny.
3) Je potřeba také vzít v potaz, že molární koncentrace sacharózy je 342,30 $g \cdot mol^{-1}$ [65] a molární koncentrace fruktózy a glukózy je 180,16 $g \cdot mol^{-1}$ [66] [67]. Při hydrolýze 1 g sacharózy tedy vzniká 1,053 g invertního cukru. Finální refraktometrická sušina invertního sirupu bude tedy vyšší než původní sušina rozpuštěné sacharózy před hydrolýzou, i když počítáme s nižší refraktometrickou sušinou invertního cukru oproti sacharóze viz kapitola 2.1.1. Z tohoto důvodu je nahrazení hodnoty polarizace před hydrolýzou ve vztahu (7) za hodnotu refraktometrické sušiny ve vztahu (17) a (18) dalším faktorem ovlivňující vychýlení výsledků daného refraktometricko--polarimetrického stanovení oproti výsledkům získaných pomocí HPLC/RI.

4.3 Koncentrace cukrů v roztoku připraveného dle Clergeta a Herzfelda

Pro potvrzení hypotézy, že při hydrolýze za podmínek dle Clergeta a Herzfelda (teplota 69 °C, pH 0,5 a koncentrace sacharózy 0,13 $g \cdot ml^{-1}$) vzniká vyšší poměr c(FRU):c(GLU) než při výrobních podmínkách EDFMI byly připraveny 3 roztoky s hydrolyzovanou sacharózou viz kapitola 3.5.3. Výsledky stanovení hmotnostní koncentrace fruktózy, glukózy a sacharózy pomocí HPLC/RI ve zředěných roztocích (11,5 ml připraveného roztoku : 88,5 ml demi vody) a stanovený poměr c_m(FRU):c_m(GLU) jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Hmotnostní koncentrace fruktózy, glukózy a sacharózy v roztocích připravených dle Clergeta a Herzfelda (ředění 11,5 ml roztoku : 88,5 ml demi vody)

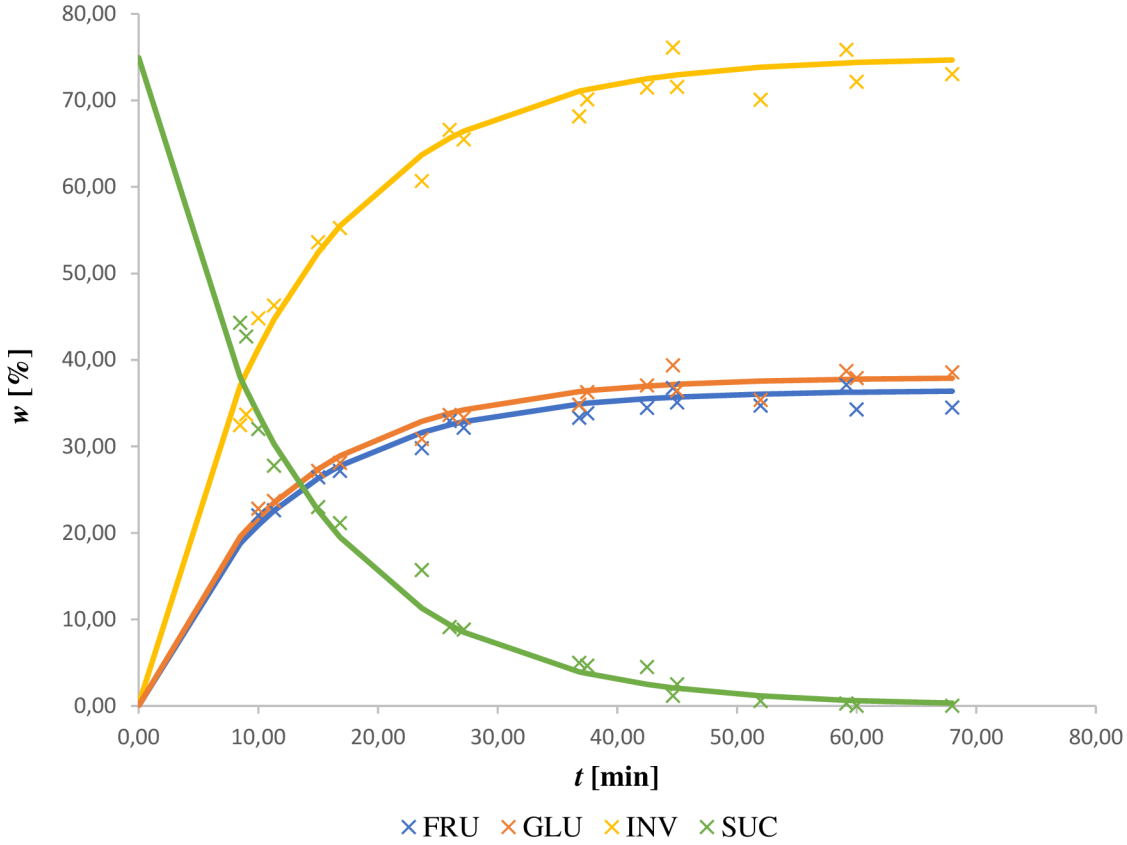
Roztok	c_m(FRU) [mg·ml^{-1}]	c_m(GLU) [mg·ml^{-1}]	c_m(SUC) [mg·ml^{-1}]	c_m(FRU):c_m(GLU)
1	7,89	7,63	0,00	1,03
2	7,88	7,82	0,00	1,01
3	7,48	7,42	0,00	1,01
			$\overline{c_m(FRU):c_m(GLU)}$	1,02
			s	± 0,02

Vysvětlivky: c_m – hmotnostní koncentrace; FRU – fruktóza, GLU – glukóza, SUC – sacharóza; c_m(FRU):c_m(GLU) – poměr hmotnostní koncentrací FRU a GLU; $\overline{c_m(FRU):c_m(GLU)}$ - průměrná hodnota poměru hmotnosních koncentrací FRU a GLU; s – výběrová směrodatná odchylka hodnot $\overline{c_m(FRU):c_m(GLU)}$ vypočtená dle vztahu (10)

Poměr c_m(FRU):c_m(GLU) byl stanoven na 1,02 ± 0,02 %. Na základě tohoto výsledku lze dojít k závěru, že roztok hydrolyzované sacharózy připravený dle Clergeta a Herzfelda obsahuje velmi podobné množství fruktózy a glukózy a že se jedná téměř o ekvimolární směs těchto dvou cukrů. Jelikož fruktóza a glukóza mají stejnou molární hmotnost viz kapitola 4.2 je poměr hmotnostních koncentrací fruktózy a glukózy totožný s poměrem molárních koncentrací fruktózy a glukózy.

4.4 Koncentrace cukrů v invertním sirupu připraveného za výrobních podmínek

Změnu naměřené koncentrace (hmotnostního zlomku ve vzorku) jednotlivých cukrů během sledované kyselé hydrolýzy sacharózy za výrobních podmínek (pH 2,4, teplota 80 °C, počáteční koncentrace sacharózy 75 %) lze vidět na Obr. 10. Sacharóza dle očekávání exponenciálně klesá, hydrolyzuje se na fruktózu a glukózu, jejichž koncentrace v čase narůstá. Fruktózy ovšem vzniká méně než glukózy.



Obr. 10: Změna koncentrací fruktózy, glukózy, sacharózy a invertního cukru během kyselé hydrolýzy (pH 2,4, teplota 80 °C, počáteční koncentrace sacharózy 75 %) stanovených pomocí HPLC/RI

Poměr c_m(FRU):c_m(GLU) v sirupech připravených v laboratoři za výrobních podmínek se v rozmezí stupně inverze 40–90 % pohyboval mezi hodnotami 0,95–0,98, jeho průměr byl stanoven na 0,96 ± 0,01. V rozmezí stupně inverze 40–100 % se hodnoty poměru c_m(FRU):c_m(GLU) pohybovaly v rozmezí 0,93–0,98, průměr pro toto rozmezí byl stanoven na 0,96 ± 0,02. Kdyby bylo vzato v potaz vychýlení koncentrací fruktózy, glukózy a sacharózy stanovených pomocí HPLC/RI od referenčních hodnot stanovených v kapitole 4.1, byl by průměrný poměr c_m(FRU):c_m(GLU) v připravených sirupech ještě nižší. U dvou vzorků byl stanoven c_m(FRU):c_m(GLU) na 0,89, resp. 0,90. Oba tyto vzorky měly stanovený stupeň inverze 100 %. Tyto výsledky poukazují na to, že po zreagování vešekeré sacharózy a ponechání sirupu při pH 2,4 a teplotě 80 °C dochází k ještě rapidnějšímu poklesu poměru c_m(FRU):c_m(GLU). Tyto 2 výsledky byly vyřazeny pro výpočet průměrného c_m(FRU):c_m(GLU) během hydrolýzy sacharózy při výrobních podmínkách.

Výsledky stanovené hmotnostní koncentrace fruktózy, glukózy, sacharózy, poměru c_m(FRU):c_m(GLU) a stupně inverze v invertních sirupech připravených za výrobních podmínek jsou shrnuty v Tab. 12.

Tab. 12: Stanovené hmotnostní koncentrace fruktózy, glukózy a sacharózy, poměru koncentrací fruktózy a glukózy a stupně inverze pomocí HPLC/RI v připravených invertních sirupech za výrobních podmínek

Vzorek	c_m (FRU) [mg/ml]	c_m (GLU) [mg/ml]	c_m (SUC) [mg/ml]	I [%]	c_m (FRU): c_m (GLU)
Invert 2_2	3,17	3,35	8,89	42,31	0,95
Invert 3_2	4,05	4,19	10,45	44,09	0,97
Invert 3_3	4,50	4,66	6,54	58,34	0,97
Invert 1_2	4,88	5,11	5,99	62,52	0,95
Invert 3_4	6,44	6,62	5,60	69,99	0,97
Invert 2_3	6,17	6,38	4,80	72,33	0,97
Invert 3_5	11,06	11,46	5,83	79,44	0,97
Invert 3_6	9,38	9,58	2,60	87,94	0,98
Invert 2_4	10,08	10,44	2,76	88,14	0,97
Invert 1_3	6,56	6,86	0,98	93,19	0,96
Invert 2_5	10,26	11,00	1,41	93,78	0,93
Invert 3_7	7,61	8,18	0,99	94,10	0,93
Invert 2_6	11,34	11,78	0,81	96,62	0,96
Invert 1_4	9,52	10,20	0,30	98,50	0,93
Invert 1_5	7,81	7,96	0,13	99,18	0,98
Invert 1_6	11,62	12,12	0,09	99,62	0,96
Invert 2_7	8,80	9,73	0,00	100,00	0,90
Invert 1_7	7,76	8,68	0,00	100,00	0,89

Vysvětlivky: c_m – hmotnostní koncentrace; FRU – fruktóza, GLU – glukóza, SUC – sacharóza; *I* – stupeň inverze stanovený pomocí HPLC/RI; c_m(FRU):c_m(GLU) – poměr hmotnostní koncentrací FRU a GLU

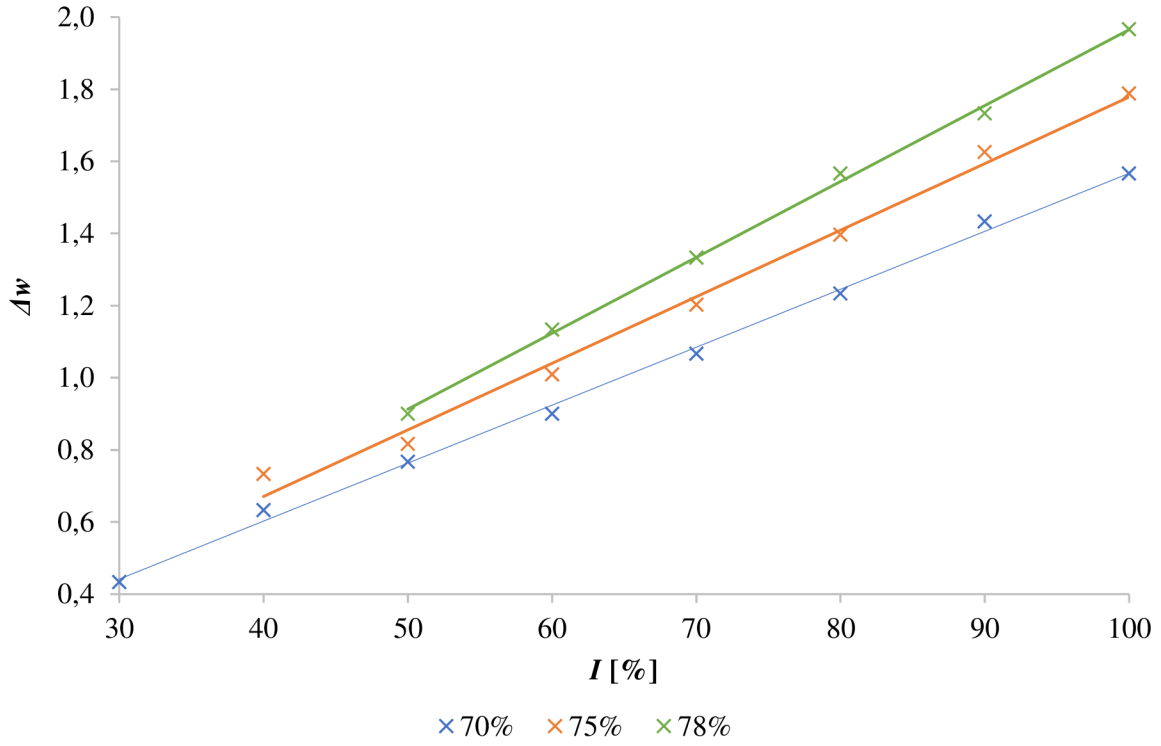
Vysvětlení značení vzorků: Invert X_Y – (X – pořadové číslo přípravy sirupu, Y – pořadové číslo odběru v rámci jedné přípravy)

Porovnáním stanovených koncentrací cukrů v roztoku připraveného dle Clergeta a Herzfelda s koncentracemi cukrů v invertních sirupech připravených za výrobních podmínek lze potvrdit hypotézu, že za podmínek dle Clergeta a Herzfelda vzniká invertní cukr o vyšším c_m(FRU):c_m(GLU) než za výrobních podmínek (80 °C, pH 2,4 a koncentrace sacharózy 75 % před hydrolýzou). To je způsobeno zřejmě tím, že při vysokých koncentracích cukru je větší pravděpodobnost, že D-fruktofuranózový kation bude reagovat s přítomnými cukry za vzniku kestózy a fruktóza-dianhydridu viz kapitola 2.2.1.

4.5 Optimalizace stanovení invertního cukru v invertních sirupech pomocí polarizace a refraktometrie

Za účelem snížení rozdílu výsledků stupně inverze stanoveného pomocí HPLC/RI a refraktometricko-polarimetrického stanovení byla sledována závislost stupně inverze na refraktometrické sušině a polarizaci u standardních sirupů. Poměr koncentrace fruktózy a glukózy v těchto standardních sirupech byl 0,96, což je průměrný poměr c_m(FRU):c_m(GLU) v invertních sirupech připravených v laboratoři za výrobních podmínek viz kapitola 4.4. U 3 invertních sirupů (dohromady 9 vzorků) nebylo možné stanovit polarizaci a refraktometrickou sušinu kvůli krystalizaci z důvodu vysoké sušiny a malého podílu invertního cukru. Jednalo se konkrétně o sirup o koncentraci celkových cukrů 75 % a stupni inverze 30 % a sirupy o koncentraci celkových cukrů 78 % a stupni inverze 30 % a 40 %.

Ze získaných výsledků refraktometrické sušiny je možné vidět, že se zvyšující se koncentrací invertního cukru v sirupu se rozdíl mezi reálnou sušinou a naměřenou refraktometrickou sušinou zvyšuje viz Obr. 11. Čím vyšší reálná sušina, tím je tento rozdíl větší. Ve všech 3 případech (pro reálnou sušinu 70 %, 75 % a 78 %) se jedná o silnou lineární pozitivní korelaci (r = 1,0).



Obr. 11: Závislost rozdílu refraktometrické sušiny od skutečné sušiny (Δw) na stupni inverze (I)

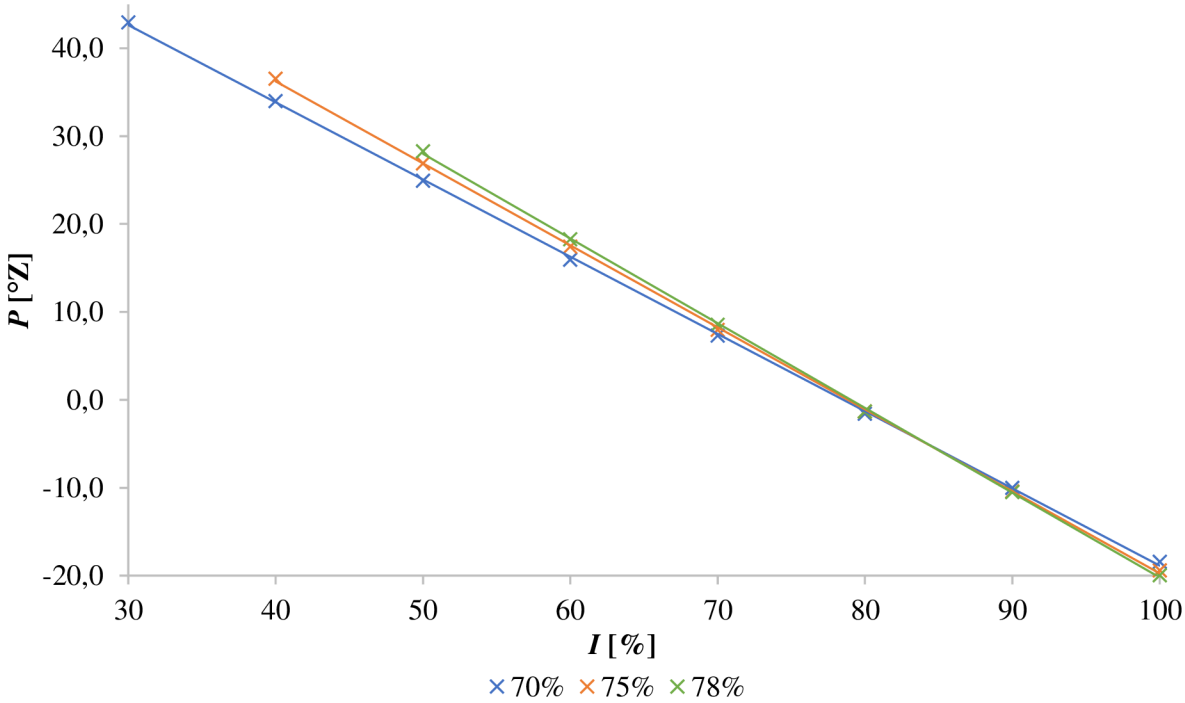
Získané výsledky refraktometrické sušiny byly totožné v rámci chyby měření (± 0,1 °Bx) s výsledky refraktometrické sušiny vypočtené dle vztahu (3) vyjadřující rozdíl reálné sušiny a refraktometrické sušiny pro směsi invertního cukru a sacharózy. Vypočtené a naměřené hodnoty refraktometrické sušiny jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 13: Srovnání výsledků naměřené refraktometrické sušiny (Bx) a vypočtené refraktometrické sušiny dle vztahu (3)

***w* [%]**	70		75		78	
***I* [%]**	***Bx*výpočet [°Bx]**	***Bx*změřeno [°Bx]**	***Bx*výpočet [°Bx]**	***Bx*změřeno [°Bx]**	***Bx*výpočet [°Bx]**	***Bx*změřeno [°Bx]**
30	69,6	69,6 ± 0,1	-	-	-	-
40	69,4	69,4 ± 0,1	74,3	74,3 ± 0,1	-	-
50	69,3	69,2 ± 0,1	74,2	74,2 ± 0,0	77,1	77,1 ± 0,0
60	69,1	69,1 ± 0,0	74,0	74,0 ± 0,1	76,9	76,9 ± 0,1
70	68,9	68,9 ± 0,1	73,8	73,8 ± 0,0	76,7	76,7 ± 0,1
80	68,8	68,8 ± 0,1	73,6	73,6 ± 0,1	76,5	76,4 ± 0,1
90	68,6	68,6 ± 0,1	73,4	73,4 ± 0,1	76,3	76,3 ± 0,1
100	68,5	68,4 ± 0,1	73,2	73,2 ± 0,1	76,1	76,0 ± 0,1

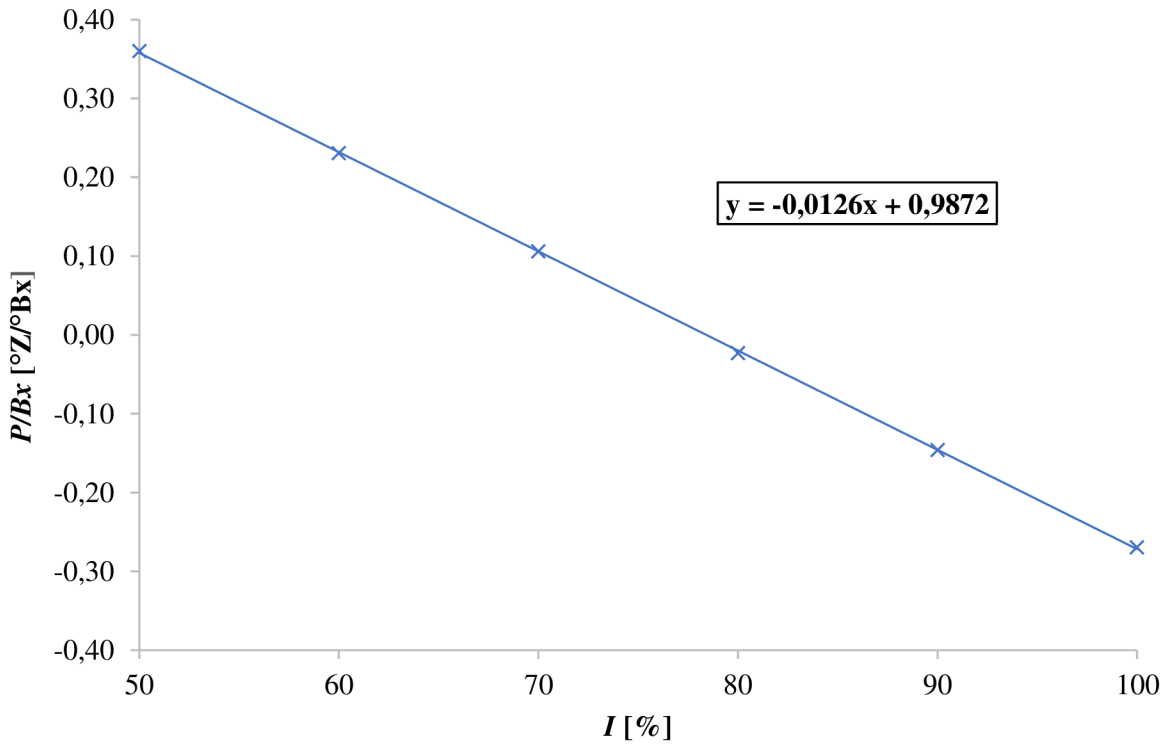
Vysvětlivky: w – hmotnostní procento koncentrace cukrů (g cukrů/ 100 g sirupu); *I* – stupeň inverze; *Bx* – refraktometrická sušina

Obr. 12 zobrazuje závislost změřené polarizace na stupni inverze připravených sirupů. Ve všech 3 případech se jedná o silně lineární zápornou korelaci (r = −1,0). Se zvyšujícím se stupněm inverze polarizace klesá a dosahuje záporných hodnot kvůli přítomnosti levotočivé fruktózy. Nejnižší polarizace o hodnotě −20,0 ± 0,2 °Z byla změřena pro sirup o sušině 78 % a stupni inverze 100 %.

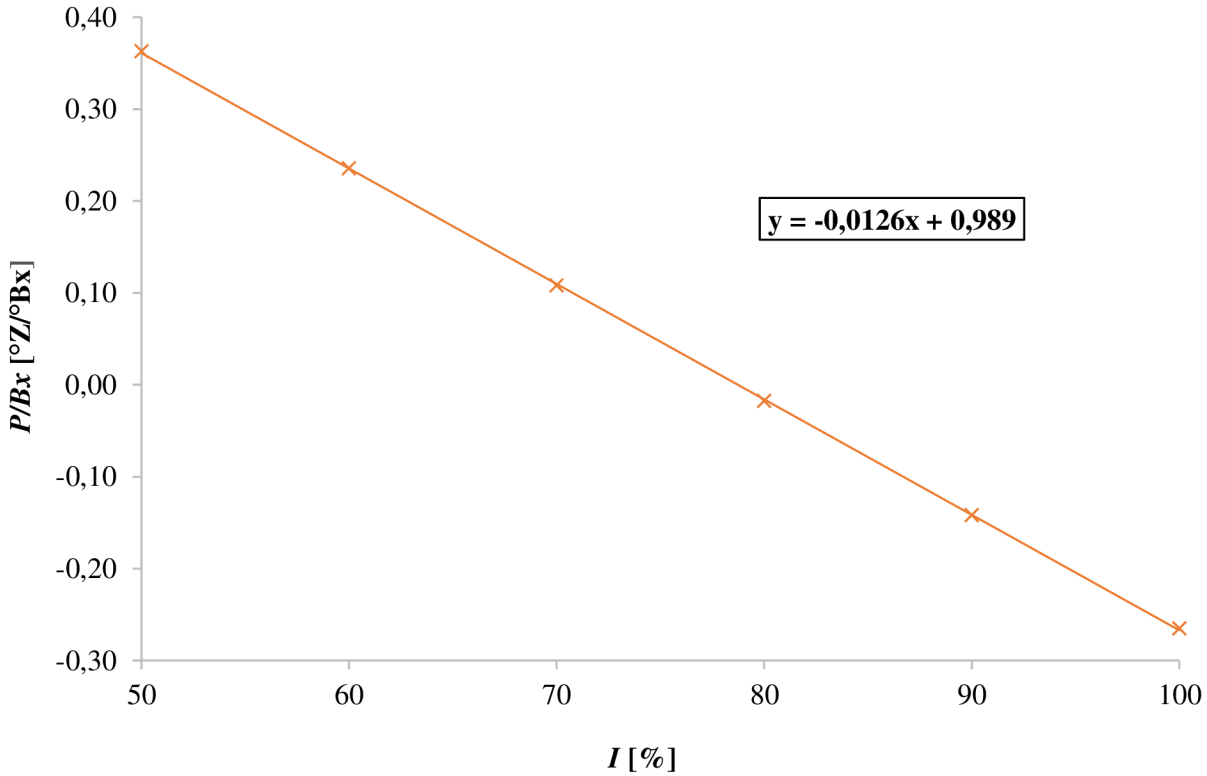


Obr. 12:Závislost polarizace (P) na stupni inverze (I)

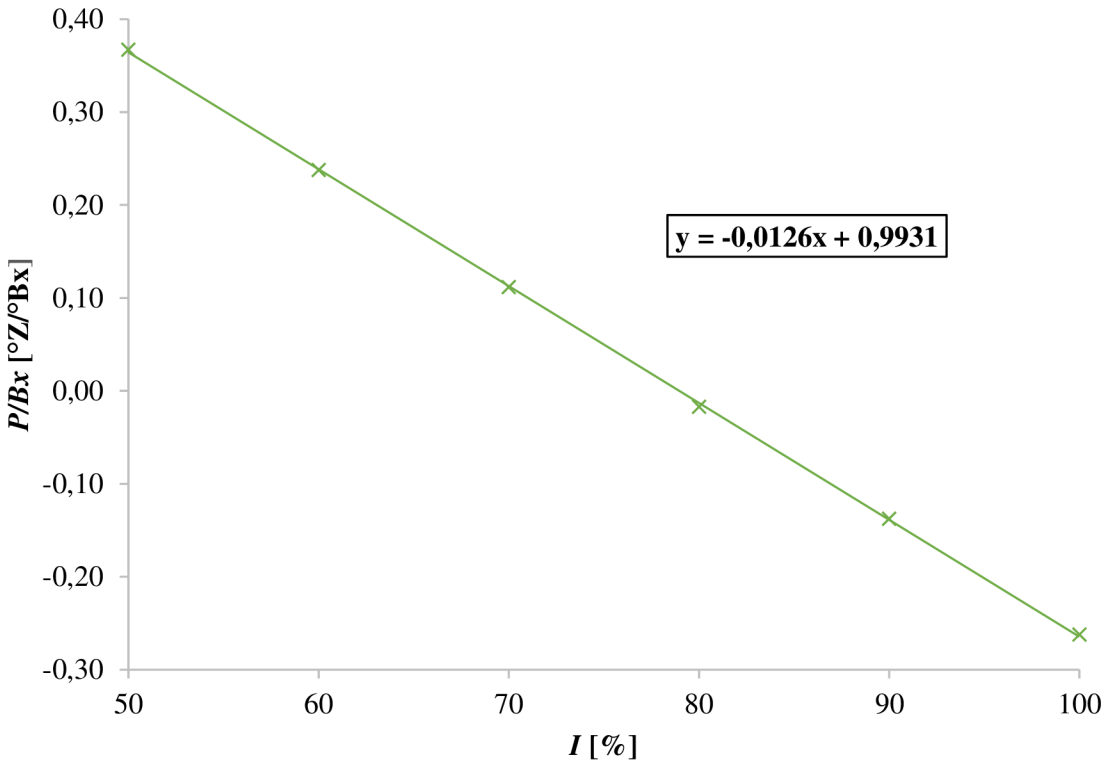
Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že podíl P/Bx je lineárně závislý na stupni inverze. Obr. 13, Obr. 14 a Obr. 15 zobrazují tuto lineární závislost pro sušinu 70 %, 75 %, resp. 78 %.



Obr. 13: Závislost P/Bx na I pro sušinu sirupu 70 %



Obr. 14: Závislost P/Bx na I pro sušinu sirupu 75 %



Obr. 15: Závislost P/Bx na I pro sušinu sirupu 78 %

Získané rovnice popisující naměřenou lineární závislost P/Bx na stupni inverze pro sušinu 70, 75 a 78 % mají stejný koeficient a (−0,0126) a velmi podobný koeficient b (≈ 0,99). Na základě získaných výsledků viz Obr. 13, Obr. 14 a Obr. 15 bylo navrženo, že stupeň inverze pro invertní sirupy připravené za výrobních podmínek EDFMI (pH 2,4, teplota 80 °C) lze z polarizace a refraktometrické sušiny vypočítat dle vztahu (21). Tento vztah je platný pro sušinu 70–78 % a stupeň inverze 50–100 %.

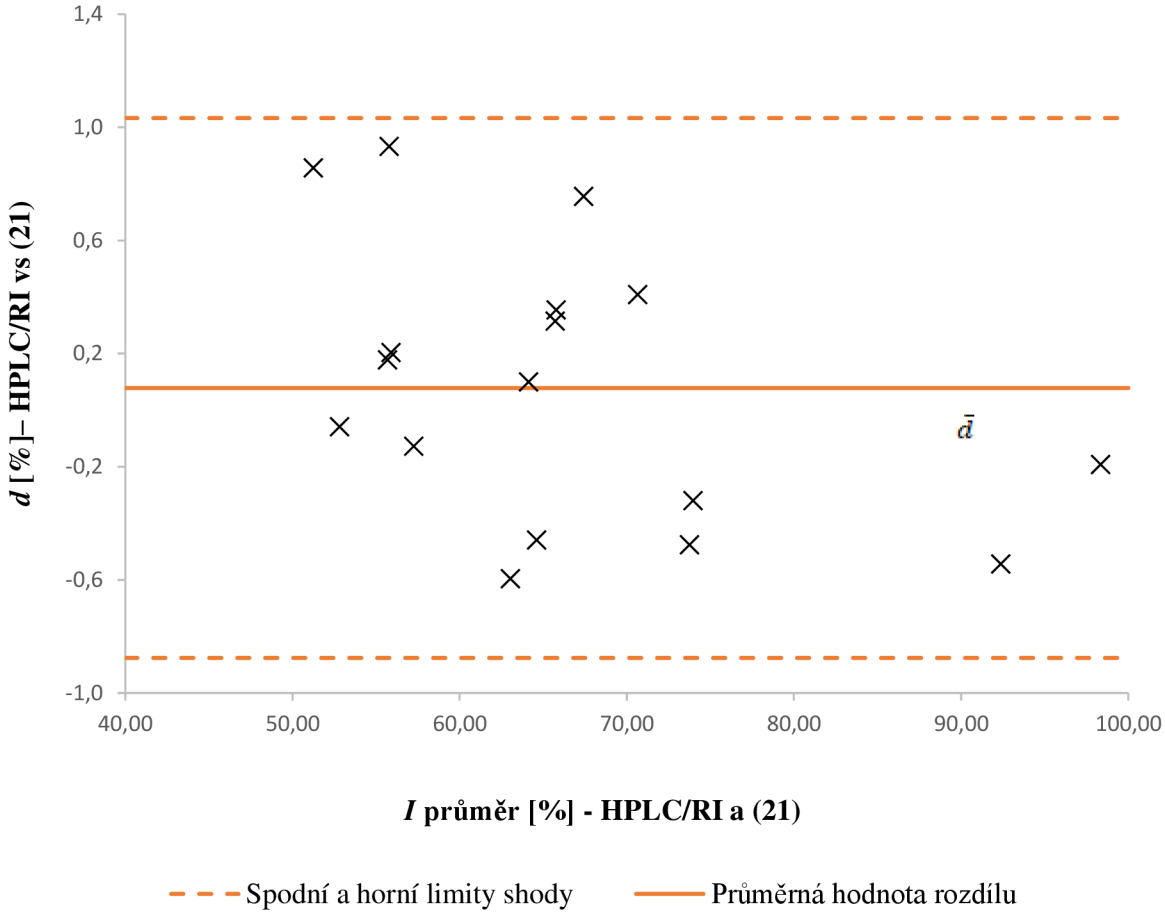
$$I = \left(\frac{P}{Bx} - 0,99\right) \cdot \left(-\frac{1}{0,0126}\right) \; [\%] \qquad (21)$$

Vysvětlivky: I – stupeň inverze; *P* – polarizace [°Z]; *Bx* – refraktometrická sušina [°Bx]

Rovnice (21) popisuje nově navržený empirický vztah v rámci této diplomové práce, který popisuje závislost stupně inverze na refraktometrické sušině a polarizaci pro invertní sirupy, které jsou vyrobeny za výrobních podmínek EDFMI.

4.6 Statistické srovnání výsledků stanovení dle nově navrženého vztahu a pomocí HPLC/RI

Pro účely srovnání výsledků stupně inverze pomocí refraktometricko-polarimetrického stanovení dle nově navrženého vztahu a pomocí HPLC/RI byl stupeň inverze oběma těmito metodami stanoven u 17 vzorků vyrobených na výrobní lince EDFMI (jednalo se o stejné vzorky, které byly použity pro srovnání refraktometricko-polarimetrického stanovení dle vztahu (18) s HPLC/RI viz kapitola 4.2. Srovnání výsledků stupně inverze získaných pomocí refraktometricko-polarimetrického stanovení dle nově navrženého vztahu (21) a pomocí HPLC/RI jsou graficky vyobrazeny v Bland-Altmanově grafu viz Obr. 16.



Obr. 16: Bland-Altmanův graf pro srovnání výsledků stanovení stupně inverze pomocí HPLC/RI a navrženého refraktometricko-polarimetrického stanovení dle vztahu (21)

Vysvětlivky: d – rozdíl výsledků HPLC/RI stanovení a stanovení dle vztahu (21); *I* průměr – průměrná hodnota výsledků HPLC/RI stanovení a stanovení dle vztahu (21)(18); Průměrná hodnota rozdílu, $\bar{d}$, vypočtena dle vztahu (14); Spodní a horní limity shody (d_{LOW}, d_{UP}) vypočteny dle vztahů (15) a (16)

Průměrný rozdíl (*d*) výsledků stupně inverze stanovených pomocí těchto dvou metod byl stanoven na základě analýzy 17 vzorků na 0,1 ± 0,5 %. 95% interval spolehlivosti byl stanoven na ± 1,0 %, což znamená, že za předpokladu, že výsledky rozdílů jsou normálně rozděleny, 95 % hodnot rozdílu výsledků stupně inverze pomocí stanovení HPLC/RI a tohoto

refraktometricko-polarimetrického stanovení by se mělo nacházet v rozmezí ± 1,0 % od průměrné hodnoty, tedy v rozmezí −0,9–1,0 % (spodní – horní limit shody). Lze předpokládat, že výsledky populace hodnot tohoto rozdílu budou mít Gaussovské rozdělení, jelikož hodnoty rozdílu stanovené na základě změření 17 vzorků byly dle Shapiro-Wilkova testu normálně rozděleny ($p = 0,393$).

Co se opakovatelnosti týče, byla přesnost nově navrženého vztahu (21) vyhodnocena jako uspokojivější než opakovatelnost při použití vztahu (18), ačkoliv ne významně. Lze tak usoudit, jak z vypočtených směrodatných odchylek průměrného rozdílu, které byly stanoveny na 0,5 % pro vztah (21) a 0,6 % pro vztah (18).

Z hlediska správnosti vzhledem k výsledkům HPLC/RI bylo refraktometricko-polarimetrické stanovení dle nově navrženého empirického vztahu (21) vyhodnoceno jako výrazně přesnější než stanovení dle vztahu (18). Průměrný rozdíl výsledků HPLC/RI a výsledků stanovení dle rovnice (21) byl totiž stanoven na 0,1 %, což je výrazně nižší hodnota rozdílu těchto dvou stanovení než stanovený průměrný rozdíl 2,7 % mezi výsledky HPLC/RI a výsledky stanovení dle rovnice (18). Výsledky získané pomocí nově navrženého vztahu (21) tedy mnohem lépe korelovaly s výsledky HPLC/RI než výsledky stanovené dle vztahu (18).

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo navrhnout nový vztah pro stanovení invertního cukru (stupně inverze) v invertních sirupech pomocí refraktometrie a polarimetrie. Tento vztah měl být optimálně co nejpřesnější v porovnání s výsledky referenčního stanovení stupně inverze pomocí HPLC/RI a především přesnější než vztah pro refraktometricko-polarimetrické stanovení stupně inverze, který aktuálně používá společnost EDFMI.

Jako referenční metoda pro ověření přesnosti aktuálně používaného vztahu (18) i nově navrženého vztahu (21) byla použita metoda HPLC/RI vycházející z IHC harmonizované metody pro med [51], která byla posouzená vzhledem ke své přesnosti (správnosti i opakovatelnosti) jako vhodná pro tyto účely. Navíc se jedná o metodu, která je udávána jako referenční pro stanovení stupně inverze v specifikacích invertních sirupů vyráběných společnosti EDFMI.

K tomu, aby bylo možné navrhnout, co nejpřesnější vztah pro stanovení stupně inverze pomocí refraktometrie a polarimetrie, bylo nutné nejdříve zjistit, jaký poměr koncentrací fruktózy a glukózy vzniká při hydrolýze sacharózy při výrobních podmínkách EDFMI (80 °C, pH 2,4 a sušina 70-78 %). Bylo zjištěno, že za výrobních podmínek při sušině 75 % vzniká v oboru hodnot stupně inverze 40–100 % poměr fruktózy a glukózy 0,96 ± 0,02.

Na základě změřených hodnot polarizace a refraktometrické sušiny u standardních invertních sirupů s poměrem fruktózy a glukózy 0,96 byl navržen vztah (21) popisující závislost stupně inverze na refraktometrické sušině a polarizaci.

$$I = \left(\frac{P}{Bx} - 0{,}99\right) \cdot \left(-\frac{1}{0{,}0126}\right) \; [\%] \qquad (21)$$

Vysvětlivky: I – stupeň inverze; *P* – polarizace [°Z]; *Bx* – refraktometrická sušina [°Bx]

Výsledky stupně inverze refraktometricko-polarimetrického stanovení dle vztahu (18) a nově navrženého empirického vztahu byly statisticky srovnány s výsledky stupně inverze získaných pomocí HPLC/RI. Stanovení dle rovnice (21) bylo vyhodnoceno jako přesnější než stanovení dle rovnice (18) co se opakovatelnosti i správnosti týče. Výsledky stanovení dle vztahu (18) a výsledky HPLC/RI se v průměru lišily o 2,7±0,6 % a průměrný rozdíl výsledků získaných pomocí nově navrženého vztahu (21) a výsledků HPLC/RI byl stanoven na 0,1 ± 0,5 %. Na základě těchto zjištění bylo vyvozeno, že použití nově navrženého vztahu (21) je vhodnější ke stanovení stupně inverze pomocí polarimetrie a refraktometrie než použití vztahu (18), čímž byl splněn hlavní cíl této práce.

V rámci této práce byl navrhnut empirický vztah pro stanovení stupně inverze v invertních sirupech pomocí polarimetrie a refraktometrie. Tento vztah lze použít pro stanovení stupně inverze v invertních sirupech vyrobených pomocí kyselé hydrolýzy a je platný pro stupeň inverze 50–100 % a sušinu invertního sirupu 70–78 %. Z pohledu budoucího výzkumu by bylo přínosné ověřit, zdali je platný i za jiných výrobních podmínek. Jelikož polarimetrie i refraktometrie jsou jednoduché, rychlé a finančně dostupné analytické metody, lze výsledky této diplomové práce jednoduše uplatnit v praxi.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] COULTATE, Tom. *Food: The Chemistry of Its Components.* Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2009. ISBN: 9780854041114.

[2] *Chambers concise dictionary.* Indie: Allied Chambers, 2007. ISBN: 9798186062363.

[3] Slovník cizích slov [online]. [cit. 14. 5 2021.]. Dostupné online: https://slovnik-cizich-slov.abz.cz/.

[4] VEIGA-SANTOS, Pricila a spol. Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch–gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. *Food Chemistry.* 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.07.048.

[5] KONKA, Weronika a Jan GRABKA. Technologické aspekty výroby sirupu z cukrovky pro potravinářský průmysl. *Listky cukrovarnické a řepařské.* Červenec – srpen 2010. Dostupné online: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/263-266.PDF.

[6] Otkrytoe aktsionernoe obshchestvo "Tuľskaja konditerskaja fabrika Jasnaja Poljana" (RU), Nauchno-issledovateľskij institut konditerskoj promyshlennosti (RU). *Method for preparing acid invert syrup and method for producing of dough for crude gingerbread.* Rusko. RU2233593C1. 13. 8 2004. [patent]

[7] Ragus - Pure Sugars & Syrups [online]. [cit. 1. 3 2021.]. Dostupné online: https://www.ragus.co.uk/product/invertsugarsyrup/.

[8] PERES, António M. a Eugénia A. Macedo. Thermodynamic properties of sugars in aqueous solutions: correlation and prediction using a modified UNIQUAC model. *Fluid Phase Equilibria.* 1996. DOI: 10.1016/S0378-3812(96)90013-8.

[9] JACKSON, Richard F. a Clara G. Silsbee. Saturation relations in mixtures of sucrose, dextrose, and levulose. *Technologic Papers of the Bureau of Standards.* 1924. DOI: 10.1016/s0016-0032(24)90177-3.

[10] YOUNG, Frank E. a Francis T. JONES. Sucrose Hydrates. The Sucrose–Water Phase Diagram. *Journal of Physical Chemistry.* 1949. DOI: 10.1021/ja01209a043.

[11] YOUNG, Frank E., Francis T. JONES, and Harold J. LEWIS. D-Fructose–Water Phase Diagram. *The Journal of Physical Chemistry.* 1952. DOI: 10.1021/j150501a015.

[12] ALVES, Lourdes A., João B. ALMEIDA E SILVA and Marco GIULIETTI . Solubility of d-Glucose in Water and Ethanol/Water Mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data.* 2007. DOI: 10.1021/je700177n.

[13] NICHOLSON, E.B. a W.S. WISE. The solubilities and heats of crystallisation of sucrose and methyl α-D-glucoside in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society.* 1955. DOI: 10.1039/JR9550002714.

[14] VAŠÁTKO, Josef a Andrej SMELÍK. Solubility of anhydrous β-D-fructose in water. *Chemical Papers (dříve Chemické Zvesti).* 1967. Sv. 21. ISSN: 1336-9075.

[15] JACKSON, Richard F. and Clara Gillis Silsbee. The solubility of dextrose in water. *Scientific Papers of the Bureau of Standards.* 1922. DOI: 10.6028/nbsscipaper.129.

[16] PENNINGTON, Neil a Charles W. BAKER. *Sugar: User's Guide To Sucrose.* New York: Van Nostrand Reinhold, 1990. ISBN: 9780442002978.

[17] KADLEC, KADLEC Pavel a Karel. Měření optických vlastností kapalin (část 2.). *Listy cukrovarnické a řepařské.* 134, č. 11. 2018 Dostupné online: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2018/PDF/388-391.pdf, 2018.

[18] VOSBURGH, Warren C. The Optical Rotation of Mixtures of Sucrose, Glucose and Fructose. *Journal of the American Chemical Society* . 1921. DOI: 10.1021/ja01435a001.

[19] BORA, Kaustav Jit, Dhrubajyoti GOSWAMI, Vasudev UPADHYAY a Dipsikha KALITA. Optical method for measuring optical rotation angle and refractive index of chiral solution. *Bulletin of Physics Project.* 2018, ISSN: 2455-9407.

[20] TSUZUKI, Y., J. YAMAZAKI and K. KAGAMI. The Specific Rotation of Fructose. *Journal of the American Chemical Society.* 1950. DOI: 10.1021/ja01159a004.

[21] KADLEC, Karel. Měření optických vlastností kapalin (část 1.). *Listy cukrovarnické a řepařské.* 134, č. 9–10. Dostupné online: http://www.cukr-listy.cz/on_line/2018/PDF/348-351.pdf, 2018.

[22] ICUMSA Methods Book, SPS-3 (2000) Refractometry and Tables. Berlín: Verlag Dr. Albert Bartens. 2019. ISBN: 978-3-87040-660-8.

[23] ICUMSA Methods Book, GS4/3/8-13 (2009) The Determination of Refractometric Dry Substance of Very Pure Syrups (Liquid sugars), Thick Juice and Run-off syrups. Berlín: Verlag Dr. Albert Bartens. 2019. ISBN: 978-3-87040-660-8.

[24] McMURRY, John. *Organická chemie.* Brno: VUTIUM. 2007. ISBN: 9788021432918.

[25] MEHTA, Bhupinder a Manju MEHTA. *Organic Chemistry.* 2. vydání. Nové Dillí: PHI Learning. 2015. ISBN: 9788120351264.

[26] COCKMAN, M.,D. G. KUBLER ,A. S. OSWALD a L. WILSON. The Mutarotation of Fructose and the Invertase Hydrolysis of Sucrose. *Journal of Carbohydrate Chemistry.* 1986. DOI: 10.1080/07328308708058870.

[27] SPECK, John C. Jr. *Advances in Carbohydrate Chemistry.* 13. vydání. 1958. ISBN: 978-0-12-007213-2, str. 63 - 103. Dostupné online: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0096533208603525.

[28] EDYE, Les A. a Margaret A. CLARKE. Sucrose Loss and Color Formation in Sugar Manufacture. [autor knihy] Fereidoon, Chi-tang HO a Nguyen VAN CHUYEN SHAHIDI. *Process-Induced Chemical Changes in Food, vol. 434.* 1998, s. 124-125. ISBN: 9781489919250

[29] MEGA, Tony L. a Robert L. VAN ETTEN. The Oxygen-18 Isotope Shift in Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 12. Position of Bond Cleavage in the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Sucrose. *Journal of the American Chemical Society.* 1988. DOI: 10.1021/ja00227a017

[30] YAMABE, Shinichi, Wei GUAN a Shigeyoshi SAKAKI. Three Competitive Transition States at the Glycosidic Bond of Sucrose in Its Acid-Catalyzed Hydrolysis. *The Journal of Organic Chemistry.* 2013. DOI: 10.1021/jo3027565.

[31] SCHOEBEL, T., S. R. TANNENBAUM a T. P. LABUZA. Reaction at Limited Water Concentration 1. Sucrose Hydrolysis. *Journal of Food Science* . 1969. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1969.tb10355.x.

[32] TORRES, A.Pinheiro a F.A.R. OLIVEIRA. Application of the acid hydrolysis of sucrose as a temperature indicator in continuous thermal processes. *Journal of Food Engineering.* 1999. DOI: 10.1016/S0260-8774(99)00054-0.

[33] BOWER, Shane, Ranil WICKRAMASINGHE, Nicholas J. NAGLE a Daniel J. SCHELL. Modeling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology.* 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.045.

[34] CHEN, James C. P. a Chung Chi CHOU. Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists. 12. vydání. Kanada: John Wiley & Sons. 1993. ISBN: 9780471530374.

[35] KODIN, G. S., N. V. PETROPAVLOVSK, G. I. ZAIKANOVA a N. N. SERGIENKO. *Method for Preparation of an Invert Sugar Syrup and Installation for Its Implementation [patent].* Sovětský svaz. SU1542520A1. 15. 7. 1987. [patent]

[36] CÁRDENAS GRANGUILLHOME, Enrique R., José Angel CÁRDENAS BARRANON, Juan José GONZÁLEZ GARZA. *Process for the production of invert liquid sugar.* Spojené státy. *US6916381B2.* 19. 6. 2003. [patent]

[37] ALEKSEEVNA, Ermolaeva Galina. *Method of producing invert sugar syrup.* Rusko. RU2084536C1. 31. 8. 1993. [patent]

[38] SHCHERBAKOVA, N.A. a spol. *Method for preparing of acid invert syrup and method for producing of dough for crude gingerbread.* Rusko. RU2233593C1. 13. 8. 2003 [patent].

[39] HAACK, Erich a Franz BRAUN. *Process for the production of invert sugar solutions from molasses*. Spojené státy. US3511705A 28.2.1967 [patent].

[40] Směrnice rady 2001/111/ES ze dne 20. prosince 2001 o některých druzích cukru určených k lidské spotřebě.

[41] MAIER, Hans G. Lebensmittel- und Umweltanalytik: Methoden und Anwendungen. Springer-Verlag. 2013. ISBN: 9783642724367.

[42] ČSN 56 0160-7 Metody zkoušení cukrovarských výrobků - Stanovení obsahu redukujících látek. Praha : Český normalizační institut, 2000.

[43] ASQUIERI, Eduardo Ramirez a spol. Comparsion of Titulometric and Spectrophotometric Approaches Towards the Determination of Total Soluble and Insoluble Carbohydrates in Foodstuff. *Carpathian Journal of Food Science and Technology.* 2019. DOI: 10.34302/crpjfst/2019.11.3.6.

[44] SHAO, Yijing a Amy Hui-Mei LIN. Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizingthe Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate. *Food Chemistry.* 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.07.083.

[45] DVOŘÁK, Lukáš, Květoslava ŠUSTOVÁ a Jiří MLČEK. Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality potravin. *Chemické listy.* 2016, Sv. 110. Dostupné online: http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/121/121.

[46] BAHRAMI, Mohammad Erfan, Masoud HONARVAR, Keivan ANSARI, Bahareh JAMSHIDI. Measurement of quality parameters of sugar beet juices using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Food Engineering.* 2020. Sv. 271, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2019.109775.

[47] SIMEONE, Maria Lúcia F. a spol. Near infrared spectroscopy determination of sucrose, glucose and fructose in sweet sorghum juice. *Microchemical Journal.* 2017. Sv. 134, DOI: 10.1016/j.microc.2017.05.020.

[48] ICUMSA Methods Book, GS8/4/6-4 (2007) The Determination of Glucose and Fructose in Beet Juices and Processing Products by an Enzymatic Method . Berlín: Verlag Dr. Albert Bartens. 2019. ISBN: 978-3-87040-660-8.

[49] NIELSEN, Suzanne. *Food Analysis.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2003. ISBN: 9780306474958.

[50] ICUMSA Methods Book, GS3-50 (2013) Determination of the Total Sugar Content of Invert Sugar Syrup by an HPLC Mehod. Berlín: Verlag Dr. Albert Bartens. 2019. ISBN: 978-3-87040-660-8.

[51] Harmonised Methods of The Inthernational Honey Comission . 2009. Dostupné online: https://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf.

[52] NAYIK, Gulzar Ahmad, Yogita SUHAG, Ishrat MAJID a Vikas NANDA. Discrimination of high altitude Indian honey by chemometric approach according to their antioxidant properties and macro minerals. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.* 2018. DOI: 10.1016/j.jssas.2016.04.004.

[53] BOGDANOV, S., E. BAUMAN. Bestimmung von Honigzucker mit HPLC. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 1988.

[54] CEKSTERYTE, Violeta a Jurgis RACYS. The Quality of Syrups Used For Bee Feeding Before Winter And Their Suitability For Bee Wintering. *Journal of Apicultural Science.* 2006. ISSN: 1643-4439 Dostupné online: https://www.biobees.com/library/general_beekeeping/feeding_nutrition/sugar_syrup_analysis_feeding.pdf

[55] ICUMSA Methods Book, SPS-1 (2017) Polarimetry and the International Sugar Scale. Berlín: Verlag Dr. Albert Bartens. 2019. ISBN: 978-3-87040-660-8.

[56] ICUMSA Methods Book, GS4/7-1 (2013) The Determination of Apparent Sucrose in Molasses by a Double Polarisation Method. Berlín: Verlag Dr. Albert Bartens. 2019. ISBN: 978-3-87040-660-8.

[57] WEICHMANN, Ferdinand G. *Sugar Analysis.* 1914. ISBN: 9785878591126.

[58] ICUMSA Methods Book, GS 2/3-1 (2011) Braunschweig Method for Polarisation of White Sugar by Polarimetry - Official. Berlín: Verlag Dr. Albert Bartens. 2019. ISBN: 978-3-87040-660-8.

[59] ICUMSA Methods Book, GS 1/2/3/4/7/8/9-23 (2009) Determination of pH by a Direct Method – Official. Berlín: Verlag Dr. Albert Bartens. 2019. ISBN: 978-3-87040-660-8.

[60] SEDLAČÍK, Marek, Jiří NEUBAUER a Oldřich Kříž. *Základy statistiky: Aplikace v technických a ekonomických oborech.* 2. vydání. Praha: Grada Publishing. 2016. ISBN: 9788027191987.

[61] *ČSN ISO 5725 Přesnost (pravdivost a preciznost) metod a výsledků měření* . Praha : Ústav pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví , 2018.

[62] PILAŘOVÁ Věra, Josef TRÖGL a Václav SYNEK. Validace fotometrických stanovení dusitanů a CHSK-CR pomocí setů Spectroquant® v zasolených vodách. *Chemické Listy.* 2011, Sv. 105, Dostupné online: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_13_s55-s57.pdf?fbclid=IwAR3evlI1xTYSCHJl6qWtjL4odZsOQPArZ7u4niW7cZ0YvvEB880_1qFC7ss.

[63] BLAND, Martin J. a Douglas G. ALTMAN. Statistical Methods for Assesing Agreement between Two Methods of Clinical Measurement . *The Lancet* . 1986. DOI: 10.1016/S0140-6736(86)90837-8.

[64] *British Standard BS 976:1987 Density-composition tables for aqueous solutions of hydrocloric acid.* místo neznámé : Board of BSI, 1987. ISBN: 0580 16216 8; Dostupné online: https://allcivilstandard.com/wp-content/uploads/2019/02/BS-00976-1987-2007.pdf.

[65] National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 5988, Sucrose.* [cit. 15.7.2021]. Dostupné online: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sucrose.

[66] National Center for Biotechnolohy Information. *PubChem Compund Summary for CID 2723872, D-fructose* . [cit. 15.7.2021]. Dostupné online: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Fructose.

[67] National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Summary for CID 5793, D-Glucose.* [cit. 15.7.2021]. Dostupné online: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Glucose.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Popis
ATP	adenosintrifosfát
demi	demineralizovaná
EDFMI	E D & F Man Ingredients
FRU	fruktóza
F-6-P	fruktóza-6-fosfát
GLU	glukóza
G-6-P	glukóza-6-fosfát
HPLC/RI	kapalinová chromatografie s refraktometrickou detekcí
ICUMSA	International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis
IHC	International Honey Commission
INV	invertní cukr
lab	hodnota stanovená
$NADP^+$	nikotinamidadenindinukleotidfosfát – oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát - redukovaná forma
ref	hodnota referenční
SUC	sacharóza

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

Symbol	Popis	Jednotka
α	optická otáčivost	°
$[\alpha]_{\lambda}^{T}$	měrná optická otáčivost	°·ml·g^{-1}·dm^{-1}
B	relativní vychýlení (Bias)	%
Bx	refraktometrická sušina	°Bx
c	molární koncetrace	mol·dm^{-3}
c_g	hmotnostní koncentrace	g. ml^{-1}
c_m	hmotnostní kocentrace	mg·ml^{-1}
c_i	molární koncentrace invertního cukru v daný čas	mol·dm^{-3}
c_{S_0}	počáteční molární koncentrace sacharózy	mol·dm^{-3}
d	rozdíl stanovených hodnot pomocí referenční a srovnávané metody	
$\bar{d}$	průměrná hodnota hodnot rozdílu	
d_{LOW}	spodní limit shody	
d_{UP}	horní limit shody	
Δw	rozdíl reálné sušiny a refraktometrické sušiny	
I	stupeň inverze	%
$\bar{I}$	průměrná hodnota stanovení stupně inverze pomocí referenční a srovnávané metody	%
$I_{HPLC/RI}$	stupeň inverze stanovený pomocí HPLC/RI [%]	%
I_{REFPOL}	stupeň inverze stanovený pomocí refraktometrie a polarimetrie	%
k	rychlostní konstanta	min^{-1}
L	délka kyvety	dm
m	hmotnost	g
n	index lomu	
N	počet měření	
P	polarizace	°Z
P_0	polarizace před inverzí	°Z
ρ	hustota	g·ml^{-1}
s	směrodatná výběrová odchylka	

S	hmotnostní zlomek invertního cukru (původní sacharózy) ve vzorku	%
t	čas	min
T	teplota	°C
V	objem	ml
w	hmotností procento [%]	%
w_{TS}	hmotnostní procento celkových cukrů v roztoku [%]	%
w_{INV}	hmotnostní procento invertního cukru v roztoku [%]	%
x	naměřená hodnota	
$\bar{x}$	průměrná hodnota všech měření	
μ	referenční hodnota	
°Bx	stupeň Brix	
°Z	stupeň polarizace	

9 SEZNAM POJMŮ

Pojem	Popis
Invertní cukr	ekvimolární směs fruktózy a glukózy
Invertní sirup	tekuté sladidlo obsahující invertní cukr
Inverze	hydrolýza sacharózy na fruktózu a glukózu
Stupeň inverze	hmotnostní procento invertního cukru v sušině invertního sirupu
Index lomu	veličina popisující šíření záření v látce
Refraktometrická sušina	koncentrace cukru v roztoku daného cukru stanovený na základě závislosti indexu lomu na koncentraci daného cukru
Optická otáčivost	veličina popisující optickou aktivitu látky
Měrná optická otáčivost	optická otáčivost dané látky o koncentraci 1 $g.ml^{-1}$ změřená při délce kyvety 1 dm při dané vlnové délce zdroje světa a teplotě měření
Polarizace	koncentrace sacharózy v roztoku čisté sacharózy změřená na základě závislosti optické otáčivosti na koncentraci sacharózy
Přesnost metody	pojem charakterizjící míru odchylek dané metody od referenční hodnoty (metody), přesnost zahrnuje správnost a preciznost
Správnost metody	pojem charakterizující těsnost shody výsledků dané metody s přijatou referenční hodnotou stanovovaného parametru
Preciznost metody	pojem charakterizující těsnost shody mezi nezávislými výsledky získané pomocí dané metody
Opakovatelnost metody	pojem charakterizující preciznost metody pomocí měření za podmínek opakovatelnosti (jednotlivá měření provedena v téže laboratoři, tímtéž operátorem, za použití téhož vybavení během krátkého časového rozmezí)
Reprodukovatelnost metody	pojem charakterizující preciznost metody pomocí měření za podmínek reprodukovatelnosti (jednotlivá měření provedena v různých laboratořích, různými operátory a na různých zařízení)

10 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Ukázka připravených standardních sirupů pro stanovení závislosti stupně inverze na polarizaci a refraktometrické sušině

Příloha 2: Ukázka naředěných vzorků pro stanovení polarizace

Příloha 3: Ukázka chromatogramu získaného pomocí HPLC/RI – stanovení fruktózy, glukózy a sacharózy v invertním sirupu

Příloha 4: Zdrojová data pro Obr. 9

Příloha 5: Zdrojová data pro Obr. 10

Příloha 6: Zdrojová data pro Obr. 11

Příloha 7: Zdrojová data pro Obr. 12

Příloha 8: Zdrojová data pro Obr. 13

Příloha 9: Zdrojová data pro Obr. 14

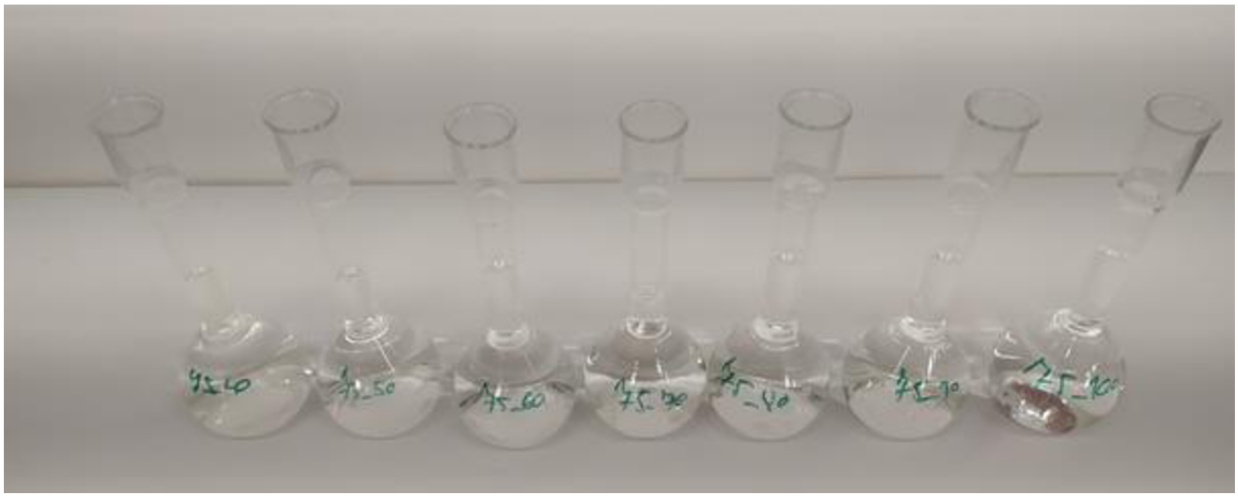
Příloha 10: Zdrojová data pro Obr. 15

Příloha 11: Zdrojová data pro Obr. 16

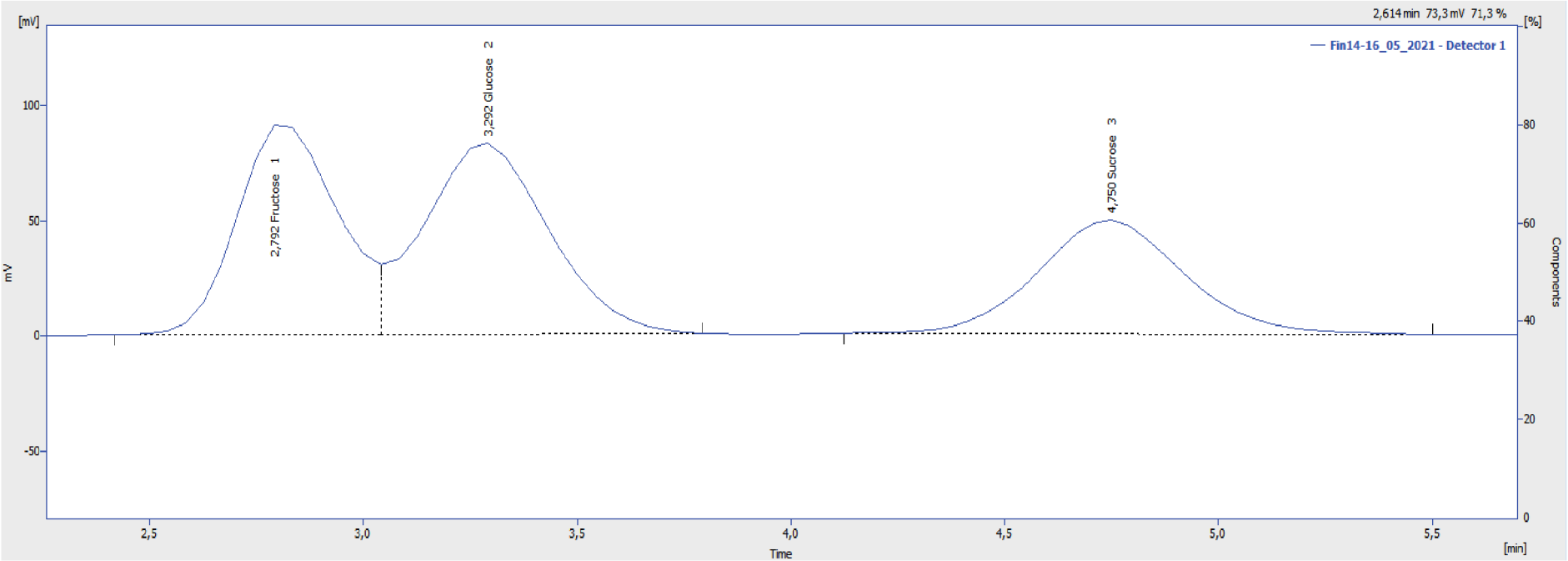
11 PŘÍLOHY

Příloha 1: Ukázka připravených standardních sirupů pro stanovení závislosti stupně inverze na polarizaci a refraktometrické sušině

Příloha 2: Ukázka naředěných vzorků pro stanovení polarizace



Příloha 3: Ukázka chromatogramu získaného pomocí HPLC/RI – stanovení fruktózy, glukózy a sacharózy v invertním sirupu



Příloha 4: Zdrojová data pro Obr. 9

Číslo vzorku	I_{HPLC} [%]	I_{REFPOL} [%]	d	$\overline{I}$ [%]
1	62,7	60,9	1,8	61,8
2	52,8	50,9	1,8	51,9
3	57,2	55,2	2,0	56,2
4	64,4	62,3	2,0	63,4
5	56,0	53,8	2,3	54,9
6	73,5	71,0	2,5	72,3
7	64,2	61,6	2,6	62,9
8	73,8	71,2	2,7	72,5
9	51,7	49,0	2,7	50,4
10	65,9	63,0	2,9	64,4
11	65,9	63,1	2,9	64,5
12	70,9	67,7	3,2	69,3
13	98,3	94,3	4,0	96,3
14	55,8	53,6	2,2	54,7
15	92,1	88,8	3,4	90,4
16	56,3	53,3	3,0	54,8
17	67,8	64,4	3,4	66,1

$\overline{d}$	s	d_{LOW}	d_{UP}
2,7	0,6	1,5	3,8

Vysvětlivky: $\overline{I}$ – průměrná hodnota stanovení stupně inverze pomocí referenční a srovnávané metody [%], $I_{HPLC/RI}$ – stupeň inverze stanovený pomocí HPLC/RI [%]; I_{REFPOL} – stupeň inverze stanovený pomocí refraktometrie a polarimetrie dle vztahu (18) [%]; d_{LOW} – spodní limit shody; d_{UP} – horní limit shody; $\overline{d}$ – průměrná hodnota rozdílu; s – výběrová směrodatná odchylka průměrné hodnoty rozdílu

Příloha 5: Zdrojová data pro Obr. 10

Vzorek	t [min]	w (FRU) [%]	w(GLU) [%]	w(INV) [%]	w(SUC) [%]
Invert 2_2	8,50	15,79	16,68	32,47	44,27
Invert 3_2	9,00	16,54	17,12	33,66	42,69
Invert 3_3	10,00	22,02	22,80	44,81	32,00
Invert 1_2	11,33	22,61	23,68	46,29	27,76
Invert 3_4	15,00	26,44	27,18	53,61	22,99
Invert 2_3	16,83	27,16	28,08	55,24	21,13
Invert 3_5	23,67	29,80	30,87	60,67	15,71
Invert 3_6	26,00	32,95	33,65	66,60	9,13
Invert 2_4	27,17	32,16	33,31	65,48	8,81
Invert 1_3	36,83	33,32	34,84	68,16	4,98
Invert 2_5	37,50	33,83	36,27	70,10	4,65
Invert 3_7	42,50	34,45	37,03	71,48	4,48
Invert 1_4	45,00	35,09	36,45	71,53	2,51
Invert 2_6	44,67	36,74	39,37	76,11	1,16
Invert 1_5	52,00	34,71	35,38	70,09	0,58
Invert 1_6	59,17	37,12	38,72	75,85	0,29
Invert 2_7	60,00	34,27	37,89	72,16	0,00
Invert 1_7	68,00	34,47	38,56	73,03	0,00

Vysvětlivky: t – čas ukončení inverze*; w* – hmotnostní procento cukru v sirupu; FRU – fruktóza, GLU – glukóza, SUC – sacharóza, INV – invertní cukr

Příloha 6: Zdrojová data pro Obr. 11

I [%]		30	40	50	60	70	80	90	100
Sušina 70 %		0,4	0,6	0,8	0,9	1,1	1,2	1,4	1,6
Sušina 75 %	***Δw***	-	0,7	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8
Sušina 78 %		-	-	0,9	1,1	1,3	1,6	1,7	2,0

Vysvětlivky: I – stupeň inverze; *Δw* – rozdíl refraktometrické sušiny od skutečné sušiny

Příloha 7: Zdrojová data pro Obr. 12

	Sušina 70 %	Sušina 75 %	Sušina 78 %
***I* [%]**		***P* [°Z]**	
30	43,0 ± 0,1	-	-
40	34,0 ± 0,1	36,6 ± 0,1	-
50	24,9 ± 0,2	26,9 ± 0,1	28,3 ± 0,3
60	15,9 ± 0,3	17,4 ± 0,1	18,3 ± 0,1
70	7,3 ± 0,1	8,0 ± 0,2	8,6 ± 0,1
80	−1,6 ± 0,2	−1,3 ± 0,1	−1,3 ± 0,0
90	−10,0 ± 0,1	−10,4 ± 0,0	−10,5 ± 0,2
100	−18,4 ± 0,2	−19,4 ± 0,1	−20,0 ± 0,2

Vysvětlivky: *I* – stupeň inverze; *P* – polarizace

Příloha 8: Zdrojová data pro Obr. 13

I	50	60	70	80	90	100
P/Bx	0,36	0,23	0,11	−0,02	−0,15	−0,27

Vysvětlivky: I – stupeň inverze; *P* – polarizace; *Bx* – refraktometrická sušina

Příloha 9: Zdrojová data pro Obr. 14

***I* [%]**	50	60	70	80	90	100
***P/Bx* [°Z/°Bx]**	0,36	0,24	0,11	−0,02	−0,14	−0,27

Vysvětlivky: I – stupeň inverze; *P* – polarizace; *Bx* – refraktometrická sušina

Příloha 10: Zdrojová data pro Obr. 15

***I* [%]**	50	60	70	80	90	100
***P/Bx* [°Z/°Bx]**	0,37	0,24	0,11	−0,02	−0,14	−0,26

Vysvětlivky: I – stupeň inverze; *P* – polarizace; *Bx* – refraktometrická sušina

Příloha 11: Zdrojová data pro Obr. 16

Číslo vzorku	I_{HPLC} [%]	I_{REFPOL} [%]	d	$\overline{I}$ [%]
1	62,7	63,3	−0,6	63,0
2	52,8	52,8	−0,1	52,8
3	57,2	57,3	−0,1	57,3
4	64,4	64,8	−0,5	64,6
5	56,0	55,8	0,2	55,9
6	73,5	74,0	−0,5	73,8
7	64,2	64,1	0,1	64,1
8	73,8	74,1	−0,3	74,0
9	51,7	50,8	0,9	51,2
10	65,9	65,6	0,3	65,7
11	65,9	65,6	0,4	65,8
12	70,9	70,5	0,4	70,7
13	98,3	98,4	−0,2	98,3
14	55,8	55,6	0,2	55,7
15	92,1	92,7	−0,5	92,4
16	56,3	55,3	0,9	55,8
17	67,8	67,0	0,8	67,4
$\overline{d}$	s	d_{LOW}	d_{UP}	
0,1	0,5	−0,9	1,0	

Vysvětlivky: $\overline{I}$ – průměrná hodnota stanovení stupně inverze pomocí referenční a srovnávané metody [%], $I_{HPLC/RI}$ – stupeň inverze stanovený pomocí HPLC/RI [%]; I_{REFPOL} – stupeň inverze stanovený pomocí refraktometrie a polarimetrie dle vztahu (21) [%]; d_{LOW} – spodní limit shody; d_{UP} – horní limit shody; $\overline{d}$ – průměrná hodnota rozdílu; s – výběrová směrodatná odchylka průměrné hodnoty rozdílu